

Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik  
der Technischen Universität München

**Optimierung einer Kapillarelektrophorese-Elektrospray-  
Massenspektrometrie (CE-ESI-MS)-Kopplung zur  
Strukturidentifizierung und quantitativen Analyse von ausgewählten  
polaren, organischen Substanzen**

**Franz Menzinger**

Vollständiger Abdruck der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,  
Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des  
akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

**Vorsitzender:** Univ.-Prof. Dr. rer. nat. W. Huber

**Prüfer der Dissertation:** 1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat., Dr. h.c. (RO) A. Kettrup  
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat., Dr. agr. habil. H. Parlar

Die Dissertation wurde am 1.10.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung  
und Umwelt am 9.12.2002 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom August 1999 bis Juli 2002 im Institut für Ökologische Chemie (IÖC), Außenstelle Freising-Attaching des Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit (GSF) angefertigt.

### **An dieser Stelle gilt mein herzlicher Dank:**

...Herrn Prof. Kettrup für die Vergabe des Themas, die finanzielle Unterstützung, das rege Interesse am Fortgang meiner Arbeit sowie für die Übernahme des Referrats.

...Herrn Prof. Parlar für die Übernahme des Koreferats.

...besonders Herrn Dr. Philippe Schmitt-Kopplin für die stets wohlwollende und konstruktive Betreuung in den letzten drei Jahren.

...Herrn Dr. Dieter Freitag (seit Oktober 2001 in Ruhestand) für die immerwährende Unterstützung für das Arbeiten am Institut in Attaching.

...meinen weiteren Kollegen in Attaching: Frau Brigitte Look, Frau Heidi Neumeir, Frau Silvia Thaller, Frau Anita Wüst, Herrn Dipl.-Geogr. Jens Junkers, Herrn Dipl.-Biol. Moritz Frommberger für die gute Zusammenarbeit.

...Frau Dipl.-Chem. Giuliana Bianco für die Zusammenarbeit an der CE-ESI-MS während ihrer Forschungsaufenthalte in Attaching und für die Betreuung während meines Aufenthaltes in Potenza.

...meinen Eltern Friedrich Menzinger sen. sowie Ricarda Menzinger für ihre Unterstützung.

...meinem Bruder Friedrich Menzinger jun. für seine Unterstützung.

... Herrn Michael Ribback sen., Frau Annemarie Ribback, sowie Michael Ribback jun.

...und last but not least meiner treuen und liebevollen Lebensgefährtin Melanie Ribback, die mich mental unterstützt und sich sehr für den Fortgang meiner Arbeit interessiert hat. Sowie für die tatkräftigen Unterstützungen bei der Arbeitsuche, die mich ein großes Stück weitergebracht haben.

**...nochmals allen ein herzliches Dankeschön, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.**

*„Lernen ist wie Rudern gegen den Strom, hört man damit auf, treibt man zurück“*

(Laotse, chinesischer Philosoph)

*„Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens endet nicht in einem Schlußpunkt, sondern mit einem Fragezeichen“*

(Hermann Hesse)

Für meinen an Non-Hodkin schwer erkrankten und am 15.9.2002 verstorbenen Vater  
Für meine Melanie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung, Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit.....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Struktur der Vorgehensweise und Auswahl der Analyten.....</b>	<b>3</b>
<b>3.</b>	<b>Theoretische Grundlagen.....</b>	<b>7</b>
3.1.	<i>Messprinzipien der Kapillarelektrophorese.....</i>	<i>7</i>
3.1.1.	Allgemeine Grundlagen.....	7
3.1.2.	Trenntechniken in der Kapillarelektrophorese-im Hinblick auf eine Kopplung mit einem Massenspektrometer.....	10
3.2.	<i>Analyse von polaren, organischen Substanzen mittels CE und CE-ESI-MS....</i>	<i>15</i>
3.2.1.	Kenntnisstand über die Analyse von Agrochemikalien mittels CE und CE-ESI-MS.....	15
3.2.1.1.	Für die CE-Analytik verwendete Proben.....	26
3.2.1.2.	Extraktions-und Aufkonzentrierungstechniken.....	26
3.3.	<i>Theorie des Elektrospray-Prozesses.....</i>	<i>30</i>
3.3.1.	Allgemeine Grundlagen.....	30
3.3.2.	Kopplung einer Kapillarelektrophorese mit einem Massenspektrometer via Elektrospray-Interface.....	36
3.3.3.	CE-ESI-MS und HPLC-ESI-MS: Ein Vergleich hinsichtlich der Applikation des Elektrospray-Prozesses.....	36
3.3.4.	Elektrospray-Stabilität und –Instabilität in CE-ESI-MS- Experimenten.....	37
<b>4.</b>	<b>Experimentelle Ergebnisse und deren Diskussion</b>	
4.1.	<i>Entwicklung von CE-Methoden zur quantitativen Analytik von ausgewählten Agrochemikalien (zunächst ohne MS).....</i>	<i>39</i>

4.1.1	Partial – filling (PF) – MEKC (UV) – Methode.....	39
4.1.1.1	Struktur der analysierten Substanzen.....	39
4.1.1.2	Parameter , die eine Trennung in PF-MEKC (UV) beeinflussen.....	40
4.1.1.3	Quantifizierung.....	44
4.1.2	NACE-Methode (UV).....	49
4.1.2.1	Struktur der analysierte Substanzen.....	49
4.1.2.2	Parameter, die eine Trennung in NACE( UV) beeinflussen...	49
4.1.2.3	Quantifizierung.....	51
4.1.3	Vergleich der beiden Methoden und Schlussfolgerungen.....	53
4.1.4	On-line Aufkonzentrierung mittels mizellarem Sweeping.....	54
4.1.4.1	Sweeping mit s-Triazinen und Phenylharnstoffen.....	54
4.1.4.2	Quantitative Effekte; Normierung mit molarem Absorptionskoeffizienten.....	57
4.1.4.3	Bestätigung und Voraussage der Aufkonzentrierung.....	61
4.1.5	Off-line Aufkonzentrierung mittels Festphasenextraktion (SPE).....	64
4.1.5.1	Beschreibung qualitativer Effekte.....	64
4.1.5.2	Quantitative Beobachtungen.....	65
4.1.6	Vergleich von mizellarem sweeping und SPE.....	67
4.2	<i>Übertrag der PF-MEKC-Methode (UV) zur Analyse von s-Triazin- Herbiziden mittels CE-ESI-MS.....</i>	<i>68</i>
4.2.1	Voraussetzungen.....	68
4.2.2	Quantitative Analytik.....	75
4.2.3	PF-MEKC-ESI-MS mit hochmolekularen Tensiden: Ein Ausblick mit BBMA.....	79
4.2.4	Erklärung der quantitativen PF-MEKC-ESI-MS-Daten anhand der Spraystabilität.....	81

4.3	<i>Optimierung der CE-ESI-MS-Kopplung - Voraussetzung für eine reproduzierbare Detektionssensitivität</i> .....	82
4.3.1	Zusammenfassung wichtiger CE-ESI-MS-Parameter.....	82
4.3.2	Zusammenfassung Spraystabilität und Signalausbildung-Vergleich Original-ESI-Interface und modifiziertes ESI- Interface.....	82
4.3.3	Grundeinstellungen und Maße (Original Interface Thermo Finnigan)..	84
4.3.3.1	Höhe CE zu MS.....	84
4.3.3.2	Weitere Grundeinstellungen.....	85
4.3.4	Grundeinstellungen und Maße mit modifiziertem Interface.....	85
4.3.5	Einfluß von „sheath gas“ .....	85
4.3.5.1	Theoretischer Hintergrund und Möglichkeit der Anwendung - Original ESI-Interface.....	85
4.3.5.2	Einfluß sheath gas auf Trennungen in wässrigen Systemen.....	87
4.3.5.2.1	Interpretationsansätze des sheath gas Einflusses nach 20 cm (UV-Detektion).....	87
4.3.5.2.2	Einfluß des sheath gas flows anhand der Meßergebnisse nach 73 cm (ESI-MS-Detektion).....	91
4.3.5.3	Einfluß auf Trennungen in nichtwässrigen Systemen.....	95
4.3.6	Einfluß sheath liquid	
4.3.6.1	Theoretischer Hintergrund.....	99
4.3.6.2	Einfluß am Beispiel von ausgewählten s-Triazinen.....	99
4.3.6.3	Einfluß am Beispiel ausgewählter Adduktverbindungen..	101
4.3.6.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	102

4.3.7	Einfluß der Temperatur der heated capillary auf die Stabilität und Intensität des Analyt-Signals.....	103
4.3.7.1	Theoretischer Hintergrund.....	103
4.3.7.2	Optimierung der Temperatur für weniger thermisch labile Substanzen (am Beispiel ausgewählter s-Triazine).....	103
4.3.7.3	Optimierung der Temperatur für thermisch labile Substanzen.....	104
4.3.8	Abstand ESI - needle zu heated capillary und Optimierung der Spray – Spannung sowie CE-Kapillarenabstand.....	107
4.3.8.1	Theoretischer Hintergrund.....	107
4.3.8.2	Optimierung der Signalintensität mit 50 µm I.D. (360 µm O.D.) – Kapillaren unter Verwendung der CE-ESI-nozzle .....	108
4.3.8.3	Optimierung der Signalintensität mit 50 µm I.D. (190 µm O.D.) – Kapillaren unter Verwendung der HPLC-ESI-nozzle.....	109
4.3.9	Kopplung zweier Kapillaren mit gleichem und unterschiedlichem Durchmesser.....	116
4.3.9.1	Theoretischer Hintergrund - Der Venturi Effekt.....	116
4.3.9.2	Einsatz der „Venturi-Kapillaren“ in CE-ESI-MS.....	117
4.4	Anwendung der Optimierung der CE-ESI-MS durch qualitative und quantitative Analyse ausgewählter polarer, organischer Substanzen.....	120
4.4.1	CZE-ESI-MS-Messungen von Adduktverbindungen.....	121
4.4.1.1	Bildung von Ammoniumaddukten – strukturelle	

	Voraussetzungen.....	121
4.4.1.2	Messung der phenolischen Säuren als positives Addukt und als korrespondierende Säureanionen .....	125
4.4.1.3	Zusammenfassung und Ausblick.....	128
4.4.2	Koordinations-Ionenspray-Massenspektrometrie von ausgewählten Substanzen.....	128
4.4.2.1	Voraussetzungen.....	128
4.4.2.2	Flow injection Messungen für Substanzen mit Tendenz zur Ausbildung von $\pi$ - Komplexen.....	130
4.4.2.3	Flow injection Messungen für Substanzen mit geringer Tendenz zur Ausbildung von Koordinationskomplexen....	135
4.4.2.4	CIS-MS-Lauf mit Desethylatrazin als EOF-Marker.....	136
4.4.2.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	138
4.4.3	Bestimmung der Fragmente von drei Sulfonylharnstoffherbiziden nach Behandlung im Suntest (Photoabbau).....	139
4.4.3.1	Allgemeine Grundlagen.....	139
4.4.3.2	Tandem-MS-Experimente der Standardsubstanzen.....	140
4.4.3.3	CZE-Screening von charakteristischen Fraktionen (und darin enthaltenen Fragmenten) bei zwei unterschiedlichen pH-Werten.....	141
4.4.3.4	Identifizierung der entstandenen Photoprodukte mittels CE-ESI-MS.....	144
4.4.3.4.1	MS –und Tandem MS.....	144
4.4.3.4.2	CZE-ESI-MS-Messungen.....	151
4.4.3.5	Partial filling (PF) MEKC-ESI-MS der Standardsubstanzen.....	154
4.4.3.6	Schlußfolgerungen und Ausblick.....	155
4.4.4	Qualitativer und quantitativer Nachweis von Homoserinlactonen.....	156
4.4.4.1	Allgemeiner Teil.....	156
4.4.4.2	MS/MS-Experimente.....	157
4.4.4.3	Qualitative Analyse mittels CZE-ESI-MS und PF-MEKC-ESI-MS.....	161

4.4.4.4	Quantifizierung in PF-MEKC-ESI-MS.....	166
4.4.4.5	Realprobenmessung in CZE-ESI-MS und PF-MEKC-ESI-MS.....	167
4.4.4.6	Zusammenfassung und Ausblick.....	171
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick.....</b>	<b>172</b>
5.1	<i>Themenstellung und Ziel der Arbeit.....</i>	<i>172</i>
5.2	<i>Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse.....</i>	<i>173</i>
5.3	<i>Ausblick.....</i>	<i>181</i>
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>183</b>
6.1	<i>Chemikalien.....</i>	<i>183</i>
6.1.1	Lösungsmittel.....	183
6.1.2	Substanzen zum Herstellen von Pufferlösungen, Tensiden.....	183
6.1.3	Standardsubstanzen.....	183
6.2	<i>Apparativer Aufbau der CE-ESI-MS-Kopplung.....</i>	<i>185</i>
6.2.1	Die Kapillarelektrophorese Beckman P/ACE 5510.....	185
6.2.2	Das Massenspektrometer Thermo Finnigan LCQ duo.....	187
6.2.2.1	Ionisation bei Atmosphärendruck - API-Quelle.....	187
6.2.2.2	API-stack.....	189
6.2.2.3	Ionenoptik.....	190
6.2.2.4	Massenanalysator und Detektion der Ionen.....	191
6.2.2.5	Vakuumsystem.....	192
6.2.3	Vergleich Original-ESI-Interface mit modifiziertem ESI-Interface....	193
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>196</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ANDSA</b>	t-Aminonaphtalin-1,3-Disulfonsäure
<b>APCI</b>	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
<b>API</b>	Ionisation bei Atmosphärendruck
<b>arb</b>	arbitrary rates: Menge an Stickstoff, die in der LCQ duo Software eingestellt werden kann (20 arb = 0.3 l/min)
<b>CD</b>	Cyclodextrin
<b>CE</b>	Kapillarelektrophorese
<b>CE-ESI-MS</b>	Kapillarelektrophorese-Elektrospray-Massensepektrometrie
<b>CID</b>	Collisionsinduzierte Fragmentierung
<b>CIS-MS</b>	Koordinationsmassenspektrometrie
<b>CMC</b>	Kritische mizellare Konzentration
<b>CPPA</b>	Chlorphenoxypropionsäure
<b>CZE</b>	Kapillarzonenelektrophorese
<b>CZE-ESI-MS</b>	CZE gekoppelt mit einem Elektrospray-Massenspektrometer
<b>DAD</b>	Diodenarraydetektor
<b>DB</b>	(Dichlorphenoxy)-Buttersäure
<b>DEA</b>	Desethylatrazin
<b>DEET</b>	N,N-Diethyl-3-methyl-benzamid
<b>DIA</b>	Desisopropylatrazin
<b>DP</b>	(Dichlorphenoxy)Propansäure
<b>EOF</b>	Elektroosmotischer Fluß
<b>ESI</b>	Elektrospray
<b>GC</b>	Gaschromatographie
<b>HPLC</b>	Hochleistungschromatographie
<b>HPLC-ESI-MS</b>	HPLC gekoppelt zu einem Elektrospray-Massenspektrometer
<b>HSL</b>	Homoserinlacton
<b>I.D.</b>	Innendurchmesser
<b>Inj.</b>	Injektion
<b>k</b>	„klein k“ : Kapazitätsfaktor
<b>K</b>	„groß K“: Verteilungskoeffizient
<b>LIF</b>	Laserinduzierte Fluoreszenz

<b>LOD</b>	Nachweisgrenze bei S/N = 3
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	negativ dekadischer Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten
<b>Log k</b>	negativ dekadischer Logarithmus des Kapazitätsfaktors
<b>MCPP</b>	2-(4-Chloro-2-methylphenoxy)-Propansäure
<b>MEKC</b>	Mizellarelektrokinetische Kapillarchromatographie
<b>MS</b>	Massenspektrometer
<b>NACE</b>	nichtwässrige CE
<b>NACE-ESI-MS</b>	NACE gekoppelt zu einem Elektrospray-Massenspektrometer
<b>OH-DEA</b>	Hydroxydesethylatrazin
<b>pH*</b>	pH im nichtwässrigen Medium
<b>PPA</b>	Phenoxypropionsäure
<b>PF-MEKC</b>	Partial filling mizellarelektrokinetische Kapillarchromatographie
<b>PF-MEKC-ESI-MS</b>	PF-MEKC gekoppelt zu einem Elektrospray-Massenspektrometer
<b>ppb</b>	parts per billion (µg/l)
<b>ppm</b>	parts per million (mg/l)
<b>Quats</b>	Quaternäre Ammoniumsalze
<b>RSD%</b>	Relative Standardabweichung in %
<b>SBE</b>	Sulfobutylether
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SIM</b>	„Single Ion Monitoring“
<b>SPE</b>	Festphasenextraktion
<b>SRM</b>	„Single Reaction Monitoring“

## 1. Einleitung, Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit

Die Kapillarelektrophorese (CE) hat in den vergangenen Jahren immer mehr an Bedeutung in medizinischen [Wang et al. 1998, Yang et al. 1998] und biochemischen [Kataoka 1998, Chapman und Hobbs, 1999] Bereichen gewonnen. Erschienenene Review-Artikel zeigten die Notwendigkeit der Methodenentwicklung in der CE und Kapillarelektrochromatographie (CEC) zur Analyse von DNA, Proteinen und Peptiden, klinischen und gerichtsmedizinischen Proben [Altria, 1999 ]. Die Kapillargelelektrophorese (CGE), Kapillarisotachophorese (cITP) und Kapillarisolektrische Fokussierung (cIEF) wurden häufig für die Trennung von Biomolekülen wie Proteinen, DNA, Polysacchariden [Deyl ed., 1998] und für ganz spezielle umweltrelevante Problematiken herangezogen [Menzinger et al., 2001, Schmitt-Kopplin et al., 1997; Padaruskas et al., 1998; Michalke, Schramel, 1999 ].

Trennungen mit der Kapillarzonenelektrophorese (CZE) [Jorgenson und Lucacs, 1981,1983] und der Mizellarelektrokinetischen Kapillarchromatographie (MEKC) [Terabe et al., 1984] decken einen weiten Bereich von Analyten unterschiedlichster Polarität ab, von ionisch (anionisch, kationisch) bis hin zu neutralen Komponenten.

Die Selektivität und Auflösung der Trennungen können direkt mit verschiedenen Pufferadditivzusätzen kontrolliert werden (Lösungsmittel, komplexierende Agentien, Polymere) [Sarmini und Kenndler, 1997, Fanali, 1997].

Die klassischen chromatographischen Techniken wie GC und HPLC können in einigen Bereichen durch CE ergänzt oder sogar ersetzt werden. Der Hauptvorteil der CE im Vergleich zur klassischen Chromatographie liegt in der Trenneffizienz verbunden mit geringen Probenvolumina und ebenso geringen laufenden Kosten, wie Pufferlösungen und Quarzglaskapillaren (Kosten: 1m etwa 10 Euro, Stand: April 2002, Firma Optronis, Kehl, Deutschland). Zudem ermöglicht die rasche Konditionierung der Kapillare Analysenflexibilität innerhalb eines Tages.

Zur Detektion der Analyten in der CE werden verschiedene Techniken angewandt; hierzu zählen die klassischen UV/VIS-Detektoren, laserinduzierte Fluoreszenz (LIF) und die Kopplung mit einem Massenspektrometer. Der größte Nachteil der CE ist die geringe

Detektionssensitivität bei Verwendung von UV/VIS-Detektoren. Somit sind Aufkonzentrierungsmaßnahmen erforderlich; die Extraktion an Festphasen (SPE) wird routinemäßig als „off-line“-Methode durchgeführt. Neuere Trends spiegeln „on-line“-Methoden wider, die eine Anreicherung der Probe und die anschließende CE-Analyse in einem Schritt ermöglichen.

Kopplungen von GC und LC zu einem Massenspektrometer (MS) sind mittlerweile standardisierte analytische Methoden, während die Kopplung CE zu MS (noch) keinen Einzug in die Routineanalytik gefunden hat. Generell gesehen, gewinnt die selektive massenspektrometrische Detektion jedoch immer mehr an Bedeutung [Elgstoen et al., 2001; v. Brocke et al., 2001]. Fortschritte in der Ionenquellen-Technologie (Electrospray), die Verwendung kompatibler Puffer und die schwindenden Kosten für MS-Tischgeräte werden die Anwendung von CE-ESI-MS in der Zukunft sicher erhöhen [Banks, 1997].

Sprayverfahren wie Elektrospray (ESI) eignen sich zur Kopplung mit HPLC oder Kapillarelektrophorese (CE) [Budzikiewicz, 1998]. Allerdings sind Sprayverfahren keine Routinetechniken, bei denen man beliebig von Substanzklasse zu Substanzklasse wechseln kann [Budzikiewicz, 1998].

Im Vergleich zu einer HPLC-ESI-MS-Kopplung ist der Aufbau einer CE-ESI-MS-Kopplung aufwendiger, da mehrere Parameter für eine Trennung und Detektion einbezogen werden müssen. Die räumliche Nähe von CE- zu MS-Instrument sind wesentlich, ebenso die Höhe beider Geräte zueinander. Dies spielt bei der Kombination HPLC-ESI-MS eine eher untergeordnete Rolle. Der in der CE-Kapillare vom pH-Wert abhängige auftretende elektroosmotische Fluß (EOF) bestimmt die Flüssigkeitsmenge, die ins MS gelangt, während dagegen bei einer HPLC-ESI-MS die Pumpe der HPLC unabhängig vom pH-Wert der Lösung Flüssigkeit fördert. Nur durch Kenntnis aller Parameter, die eine CE-ESI-MS-Trennung beeinflussen, kann ein reproduzierbares Analytsignal erhalten werden.

Das Gesamtziel dieser Arbeit ist es deshalb, eine CE-ESI-MS-Kopplung für eine reproduzierbare qualitative und quantitative Analytik von ausgewählten polaren, organischen Substanzen zu optimieren, die Trennung und die Signalintensität beeinflussende und verbessernde Parameter zu untersuchen, ihrer Wichtigkeit nach zu werten und zu beurteilen.

Die Struktur der Arbeit („Einzelziele“) gliedert sich wie folgt in drei aufeinander aufbauenden Schritten:

**1a) Entwicklung CE-ESI-MS kompatibler Methoden** zur Analytik von Agrochemikalien (zunächst ohne MS).

**1b) Erhöhung der Detektionssensitivität in der CE** durch Anwendung von Aufkonzentrierungstechniken (off-line und on-line).

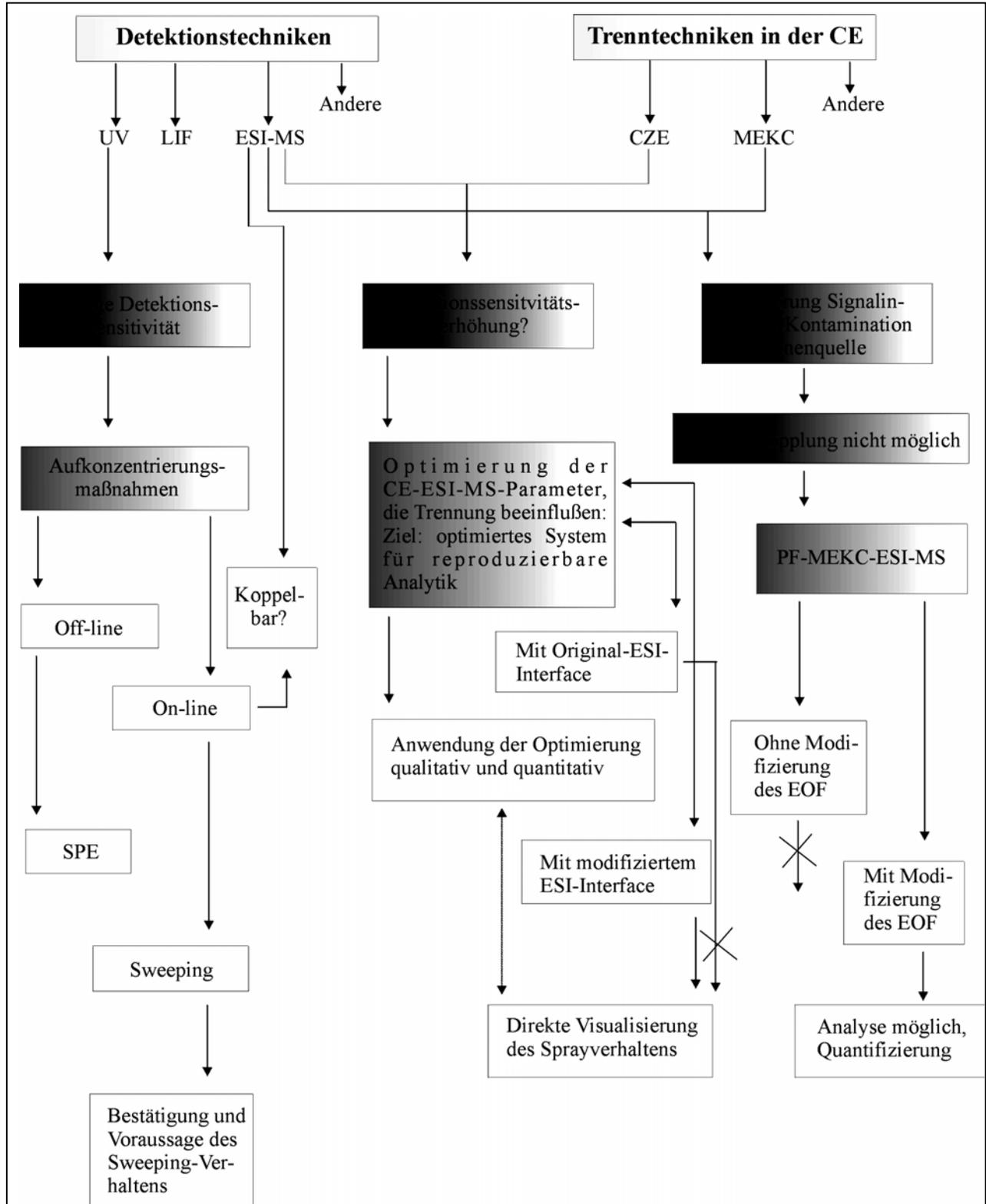
**2) Erhöhung der Detektionssensitivität in CE-ESI-MS** durch Optimierung der CE-ESI-MS-Parameter, die Trennungen beeinflussen: Herausfinden der Gewichtung und Korrelation.

**3.) Anwendung der Optimierung** auf ausgewählte polare, organische Substanzen (inklusive Agrochemikalien) und Übertrag von CE-Methoden (1a) auf CE-ESI-MS.

## **2. Struktur der Vorgehensweise und Auswahl der Analyten**

Wie war die Vorgehensweise und welche Substanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht?

Dies soll in Abb. 1 und Tab. 1 geklärt werden.



Substanzen	Ladungs- zustand	Einsatz zur Analyse in	Grund für Auswahl
s-Triazine	+/n/-	PF-MEKC (UV) NACE (UV) CZE-ESI-MS PF-MEKC-ESI- MS CIS-MS Sweeping SPE	<p>- umweltrelevante Bedeutung</p> <p>- in ihrem chemisch physikalischen Verhalten genauestens untersucht [Schmitt-Kopplin et al., 1996]</p> <p>- Möglichkeit der <math>\pi</math>-Komplexbildung</p> <p>deshalb einsetzbar:</p> <p>- für Entwicklung von UV-Methoden, die auf CE-ESI-MS übertragbar sind (vgl. Abschnitt 4.1 ff)</p> <p>- als Modellsubstanzen zur Optimierung der Kopplung (vgl. Abschnitt 4.3 ff)</p> <p>- zum Einsatz in off- und on-line Aufkonzentrierung (vgl. Abschnitt 4.1.4 ff)</p> <p>(schwache bis mittlere Hydrophobizität <math>\log K_{OW}</math> 0.2-2 bzw. 3.7</p> <p>- zur Testung der Komplexierbarkeit in CIS-MS (im Vergleich mit anderen Stoffen wie Glykolalkaloide und Homoserinlactone) (vgl. Abschnitt 4.4.2 f)</p>
Phenoxy- säuren	-	NACE (UV)	In Kombination mit Hydroxytriazinen Entwicklung einer nichtwässrigen CE-Methode zur Analyse von Kationen (Hydroxytriazine) und Anionen (Phenoxysäuren) und damit verbundener Parameter, die Trennung beeinflussen (vgl. Abschnitt 4.1.2 f)
Phenyl- harnstoffe	n	Sweeping	Neutralstoffe mit $\log K_{OW}$ 1.6-2.8 (vgl. Abschnitt 4.1.4 ff)
Sulfonyl- harnstoffe	n	CZE-ESI-MS PF-MEKC-ESI- MS	Im Rahmen einer Kinetikstudie von drei <b>Sulfonylharnstoffen</b> (Triasulfuron, Thifensulfuron, Oxasulfuron), durchgeführt mit Laura Scrano (Universita degli Studi Basilicata, Potenza, Italien): Untersuchung und Charakterisierung der Metabolite (vgl. Abschnitt 4.4.3 ff)
Homoserin- lactone	n	CZE-ESI-MS PF-MEKC-ESI- MS CIS-MS	<b>Homoserinlactone</b> wurden dünnschicht- chromatographisch getrennt (Valerie Albrecht, Institut für Bodenökologie, Arbeitsgruppe Prof. Hartmann, GSF-Neuherberg) Für diese Stoffe existieren keine CE-ESI-MS-Trennungen. Deshalb: Charakterisierung dieser Substanzen anhand von Standard- und Realproben (qualitativ und quantitativ; vgl. Abschnitt 4.4.4 ff). Möglichkeit der $\pi$ -Komplexbildung (vgl. Abschnitt 4.4.2.2 f)
PAH	n	Sweeping	Testung der on-line Aufkonzentrierung mit stark hydrophoben Substanzen, Herausfinden der Limitationen und Möglichkeiten $\log K_{OW}$ 4-6.5 (vgl. Abschnitt 4.1.4 f)
Organische Carbon- Säuren	- (als Anion)	CZE-ESI-MS (Negativmodus)	<b>Organische Carbonsäuren</b> nicht nur als Anionen nachweisbar, sondern auch als Adduktverbindungen: Diese sind im Positivmodus meßbar. Im Rahmen von

	+ (als Addukt)	CZE-ESI-MS (Positivmodus)	Untersuchungen zu Huminstoffen [Schmitt-Kopplin, 2002]: Ausbau zur „Screening – Analytik“ im Positiv- und  Negativmodus in CZE-ESI-MS (vgl. Abschnitt 4.4.1 ff).
Glyko- alkaloide	+/n	NACE-ESI-MS  CIS-MS	Zusammenarbeit mit Giuliana Bianco (Universita degli Studi Basilicata, Potenza, Italien): Untersuchung des sheath gas Einflusses in NACE-ESI-MS (vgl. Abschnitt 4.3.5.3 f)  $\pi$ - Komplexbildung? (vgl. Abschnitt 4.4.2.3 f)

**Tab. 1:** Auswahl der Substanzen zur Analytik in CE-ESI-MS; n = neutral, + = kationisch, - = anionisch

### 3. Theoretische Grundlagen

#### 3.1 Meßprinzipien der Kapillarelektrophorese

In diesem Kapitel soll eine Übersicht über Messprinzipien der CE, die Theorie des Elektrospray-Prozesses sowie den Kenntnisstand über die Analyse von Agrochemikalien gegeben werden. Die in dieser Arbeit verwendete Kapillarelektrophorese Beckman P/ACE 5510 mit DAD und Massenspektrometer Thermoquest Finnigan LCQ Duo werden im Anhang Punkt 6.2 detailliert vorgestellt.

##### 3.1.1 Allgemeine Grundlagen

Eine CE-Apparatur (Abb. 2) besteht im wesentlichen aus drei Hauptkomponenten: **1. Eine Kapillare** (im Regelfall 75  $\mu\text{m}$  oder 50  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser und 375  $\mu\text{m}$  Außendurchmesser, Länge zwischen 27 und 107 cm im Falle von Beckman-Kapillarelektrophoresen) taucht mit ihren Enden in zwei Puffervorratsgefäße ein, deren Volumen jeweils ca. 500  $\mu\text{l}$  beträgt. Nach einer gewissen Länge der Kapillare (typischerweise 50 cm) befindet sich das Detektionsfenster.

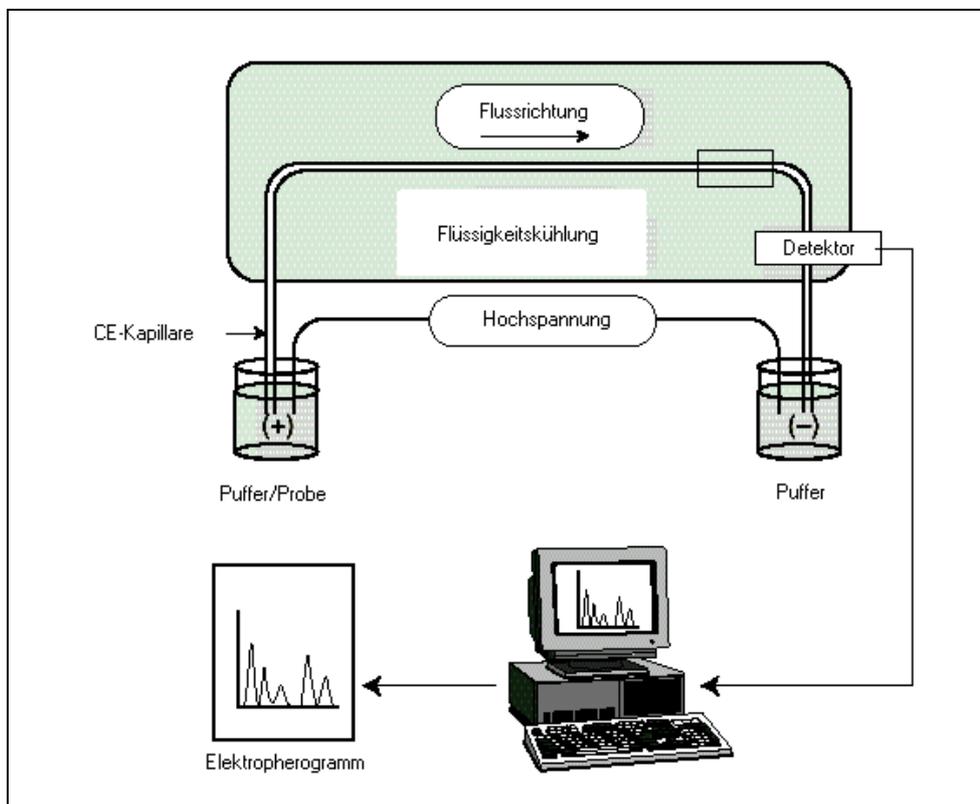
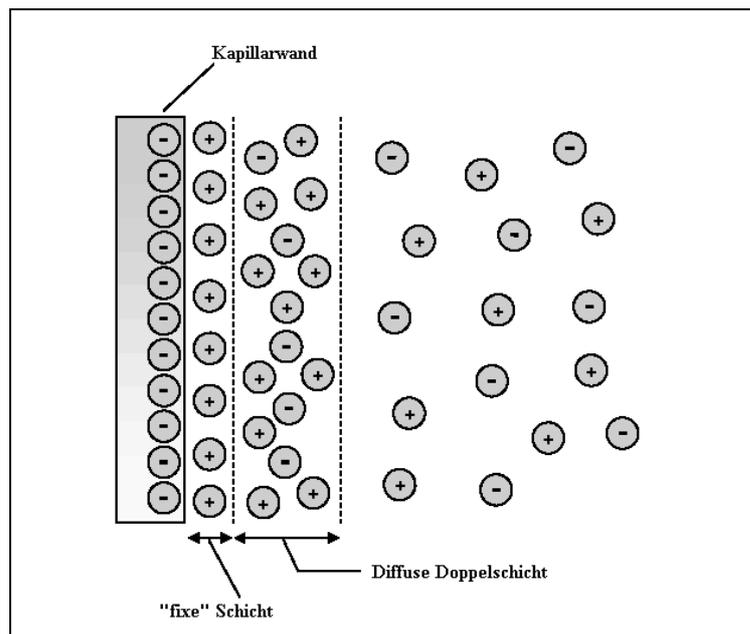


Abb. 2: Aufbau einer Kapillarelektrophorese; Erklärungen siehe Text [nach Beckman Coulter]

**2. Ein weiteres wichtiges Bauteil ist die Hochspannungsversorgung**, die  $-30$  bis  $+30$  kV stufenweise über zwei in die Pufferreservoirs hineintauchende Platinelektroden an die Kapillare anlegen kann.

**3. Ein Detektor (idealerweise ein DAD)** überträgt die ermittelten UV-Signale an einen Computer, der die Daten bzw. Elektropherogramme aufzeichnet.

Das Phänomen des **elektroosmotischen Flusses (EOF)** ist eine Konsequenz der Oberflächenladung innerhalb der nicht gecoateten Kapillare. Die ionisierbaren sauren Silanolgruppen auf der Innenwand der Kapillare dissoziieren und sind deshalb bei pH-Werten  $> 3$  negativ geladen. Positive Ionen im Puffer agieren als Gegenionen und werden von der negativ geladenen Oberfläche angezogen. Nicht alle Ionen werden angezogen, so daß nicht komplette Neutralisation eintritt. Eine diffuse Doppelschicht aus hydratisierten positiven Ionen wird gebildet. Die Potentialdifferenz zu der Innenwand ist das  $\zeta$  - Potential (Abb. 3).



**Abb. 3:** Stern's Modell der Doppelschichtladungverteilung an der negativ geladenen Kapillarinne [nach [www.rsc.org/pdf/books/capelectrosc.pdf](http://www.rsc.org/pdf/books/capelectrosc.pdf), entnommen Mai 2002 ]

Wird eine Hochspannung innerhalb der Kapillare angelegt, d.h. von positiv nach negativ (= Normalmodus), so werden die hydratisierten Kationen aus dieser diffusen Doppelschicht

zur negativ geladenen Elektrode wandern und die übrige Pufferlösung mitreißen. Auf diese Weise wird von der Kapillarenwand ausgehend ein elektroosmotischer Fluß (EOF) aufgebaut.

Wird eine Mischung aus Kationen, neutralen und anionischen Teilchen bei hohem und neutralem pH dem positiven elektrischen Feld (d.h. Anode  $\Rightarrow$  Kathode) ausgesetzt, so migrieren die Kationen zuerst zur Gegenelektrode, die Neutralteilchen wandern mit der Geschwindigkeit des EOF und Anionen werden zuletzt detektiert. Bei Umpolung der Spannung dreht sich die Reihenfolge um.

Bei niedrigem pH, wenn die Silanolgruppen protoniert sind, ist der EOF schwach, Kationen wandern mit niedrigerer Geschwindigkeit zur Kathode. Da der pH die Oberflächenladung und somit die Ladung das  $\zeta$  - Potential bestimmt, nimmt der EOF mit ansteigendem pH zu und absteigendem pH ab.

Der EOF jedoch ist abhängig von der Kapillaroberfläche manchmal schwer zu kontrollieren, so daß die Analyten mit unterschiedlicher Geschwindigkeit im elektrischen Feld wandern. Das bedeutet, daß kleine Änderungen des EOF großen Einfluß auf die Migrationszeiten der Analyten haben. Deshalb ist nicht die Migrationszeit als Charakterisierungsparameter zur Identifikation von Analyten heranzuziehen, sondern seine effektive Mobilität  $\mu_{eff}$  [Chapmann und Hobbs, 1999] (Gleichung 3).

Die Mobilität des Analyten definiert sich zu:

$$1) \quad \mu = \frac{Ld * Lt}{V * t_m}$$

Die Mobilität des EOF kann mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$2) \quad \mu_{EOF} = \frac{Ld * Lt}{V * t_{EOF}}$$

Mit Hilfe von Gleichung 1) und 2) kann die effektive Mobilität berechnet werden:

$$3) \quad \mu_{eff} = \mu - \mu_{EOF} \quad [\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{min}]$$

mit  $L_d$  = Länge Kapillare zum Detektor,  $L_t$  = Gesamtlänge der Kapillare,  $V$  = Spannung,  $t_m$  = Migrationszeit Analyt,  $t_{EOF}$  = Migrationszeit des EOF

Für Kationen ist das Vorzeichen der effektiven Mobilität positiv, für Anionen negativ.

Diese Transformation in Mobilitätsskala ist auf CE-Techniken wie CZE, CGE, MEKC und ACE anwendbar. Dadurch können für Routineanalysen notwendige Reproduzierbarkeiten (qualitativ und quantitativ) erhalten werden [Schmitt-Kopplin et al., 2001].

Für Realproben eignet sich der Vergleich der Analyten (z.B. Pestizide in realen Matrices) hinsichtlich der effektiven Mobilitäten mehr als der Vergleich der Migrationszeiten [Menzinger et al., 2000]. Zum qualitativen Vergleich kompletter Elektropherogramme wurden einige Strategien entwickelt. Darunter die Definition "quantity of charge" [Iwata et al., 1998], die Transformation der Elektropherogramme in "1/Zeit-Dimension" [Mammen et al., 1997] oder die oben beschriebene "effektive Mobilitätsskala" [Schmitt-Kopplin et al. 1998, 1999a].

### 3.1.2 Trenntechniken in der Kapillarelektrophorese – im Hinblick auf eine Kopplung mit einem Massenspektrometer

Wie eingangs erwähnt hat sich die Kapillarelektrophorese in den letzten Jahren immer mehr für medizinische, biochemische und umweltrelevante Themenstellungen etabliert. Dabei kristallisierten sich v.a. die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) und die mizellarelektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC) zur Analyse von ionischen bzw. neutralen organischen (Schad) - Stoffen heraus.

Die **Kapillarzonenelektrophorese (CZE)** stellt die einfachste Trenntechnik der CE dar. Trennungen basieren prinzipiell auf der pH abhängigen Dissoziation von sauren oder der

Protonierung von basischen Gruppen eines Moleküls. Diese ionischen Spezies werden aufgrund von Unterschieden in Ladungs/Massenverhältnissen getrennt.

Falls absolute Mobilitäten nicht bekannt sind, können Mobilitäten experimentell in Bezug auf einen internen Standard mit bekannter Mobilität oder u.a. mit Offord's empirischer Gleichung bestimmt werden. [Kuhn und Hofstetter-Kuhn, 1993].

$$6) \quad \mu_{rel} = \frac{Z}{M^{2/3}}$$

mit  $\mu$  = Mobilität,  $Z$  = totale Nettoladung,  $M$  = Molare Masse [ g.mol<sup>-1</sup>]

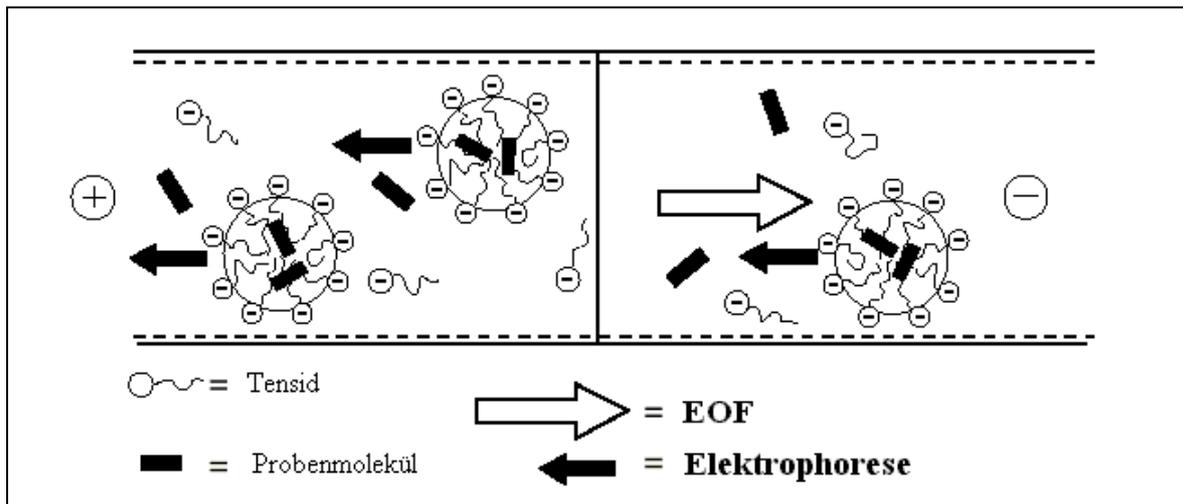
Diese Gleichung kann aber auch dazu verwendet werden, die Mobilität mit Masse/Ladungsverhältnissen zu korrelieren [Kuhn und Hofstetter-Kuhn, 1993].

Unter Einbezug des pH und der Säurekonstante (pKa) der Stoffe kann berechnet werden, wie sich  $Z/M^{2/3}$  über den gesamten pH-Bereich ändert. Im Falle von 30 verschiedenen substituierten Phenolen wurde die theoretische Variation der Ladungsdichte (mit  $Z/M^{2/3}$  angenähert) als eine Funktion des pH berechnet [Schmitt-Kopplin et al., 1999 b].

Das Trennprinzip der **mizellarelektrokinetischen Kapillarchromatographie (MEKC)** beruht auf der Interaktion von mehr oder weniger stark hydrophoben Stoffen mit dem apolaren Innenkern der negativ geladenen SDS-Mizellen, die pseudostationäre Phasen darstellen und eine eigenes elektrophoretischen Verhalten im elektrischen Feld zeigen [Kuhn und Hofstetter-Kuhn, 1993].

Oberflächenbildner liegen in polaren Lösungsmitteln nicht mehr frei vor, sondern aggregieren zu kugeligen Gebilden (üblicherweise 50-100 pro Mizelle). Typische Tenside besitzen einen apolaren Schwanz und einen polaren Kopf, der im Falle der meist verwendeten SDS - Mizellen negativ geladen ist. Bei der Bildung der Mizelle ordnen sich die apolaren Reste zur Innenseite der Mizelle, die polaren Köpfe richten sich zum Lösungsmittel hin aus.

Sie wandern zur Kathode, also entgegengesetzt zum elektroosmotischen Fluß. Da aber sich ein EOF in Richtung der Anode ausbildet und dessen Vektor größer ist als die Bewegung der Mizelle, wandert sie also im Pufferstrom in Richtung der Anode wird jedoch in ihrer Bewegung abgebremst (Abb. 4).



**Abb. 4:** Das Trennprinzip der MEKC beruht auf der Interaktion von hydrophoben Stoffen mit dem Innenkern der pseudostationären Phase, typischerweise SDS. Die sogenannte kritische Mizellarkonzentration (CMC) konnte im Falle des SDS bei 25 °C mit 8.1 und die Aggregationszahl mit 62 bestimmt werden. Die Mizellen wandern zur Kathode, werden aber aufgrund des größeren EOF - Vektors zur Anode gezogen. [nach Beckman-Coulter]

Die Analyten verteilen sich dem Kapazitätsfaktor nach

$$4) \quad K = \frac{n_{mc}}{n_{aq}}$$

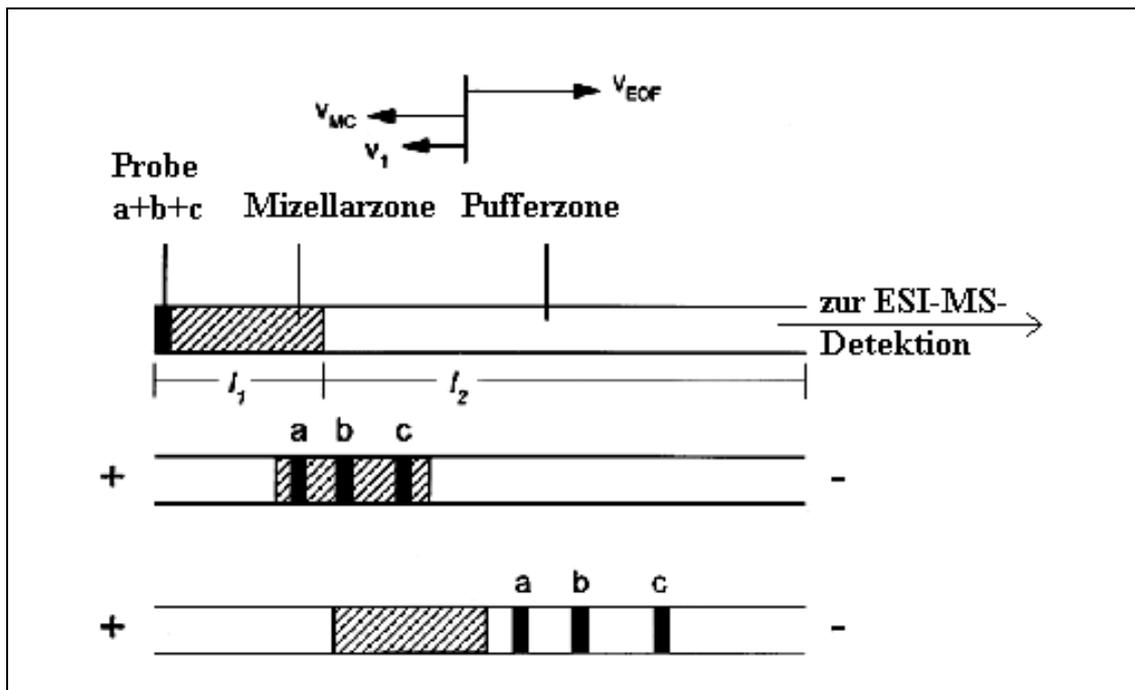
mit  $n_{mc}$  = Menge des Analyten in der mizellaren Phase und  $n_{aq}$  = Menge des Analyten in der wässrigen Phase

Das Verhältnis zwischen dem Kapazitätsfaktor und effektiven Mobilität (siehe auch Abschnitt 3.1.1) ergibt sich zu

$$5) \quad K = \frac{\mu - \mu_{eff}}{\mu_{eff}(mc) - \mu}$$

mit  $\mu$  = elektrophoretische Mobilität [ $\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{sec}$ ],  $\mu_{eff}$  = effektive elektrophoretische Mobilität,  $\mu_{eff}(mc)$  = effektive elektrophoretische Mobilität der Mizelle.

**Beide Techniken (CZE und MEKC) sind mit einem Elektrospray-Massenspektrometer (ESI-MS) koppelbar.** Während bei der CZE eine direkte Kopplung mit einem ESI-MS möglich ist, eignet sich die klassische MEKC nicht für eine direkte Kopplung. Ursache dafür sind die verwendeten, nicht flüchtigen Mizellen, die eine Kontamination der Ionenquelle verursachen und die Signalintensität reduzieren können [Nelson und Lee, 1996, a, Nelson et al., 1996 b, Yang et al., 1997]. Zur Vermeidung der Kontamination wurde in der Arbeitsgruppe von Valtcheva et al. auf der Basis der Affinitäts - Kapillarelektrophorese eine erste Form der sog. Partial-filling-Technik eingesetzt, mit der Enantiomere getrennt werden konnten, indem ein Protein zum Laufpuffer dazugemischt wurde [Valtcheva et al., 1993]. Terabe et al. modifizierte diese Technik und beschrieb die direkte Kopplung der Partial-filling-Technik mit einem Massenspektrometer [Terabe et al., 1995].



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Partial filling Technik für eine Kopplung mit einem ESI-MS. Zunächst wird mizellarfreier Hintergrundpuffer in die CE-Kapillare eingebracht, anschließend nur ein aliquoter Teil mit Mizellarpuffer. Die Trennung der Analyten erfolgt in der Mizellarzone, dort treten sie aufgrund des unterschiedlichen Bindungsverhalten zum Innenkern der SDS-Mizellen aus der Mizellarzone aus und werden vor der SDS-Front detektiert. Danach kann die Trennung gestoppt werden Eine Kontamination des MS wird dadurch verhindert. Abkürzungen:  $v_{MC}$  = elektrophoretische Geschwindigkeit der Mizellarzone,  $v_1$  = elektrophoretische Geschwindigkeit eines Analyten in der Mizellarzone,  $v_{EOF}$  = elektrophoretische Geschwindigkeit des EOF [nach Muijeselaar et al., 1998]

Die CE-Kapillare wird nur zu einem gewissen Teil mit Mizellarpuffer befüllt (Abb. 5). Im ersten Schritt jedoch wird die Kapillare mit mizellarfreien Puffer und anschließend mit

Mizellarpuffer konditioniert. Es wird Hochspannung angelegt und nach der Trennung der Substanzen kann die Analyse vor einer Kontamination der ESI-Quelle des MS mit SDS gestoppt werden [Nelson et al., 1996 b; Muijselaar et al., 1998].

Nelson und Michalke [Nelson et al., 1996; Michalke et al., 2001] zeigten, daß die Effizienz in der PF-MEKC geringer war als in der konventionellen MEKC; eine Peakverbreiterung konnte aufgrund der Grenze zwischen den zwei verschiedenen Zonen (Hintergrundelektrolyt, Mizellarpuffer) auftreten. Die größte theoretische Trennstufenzahl wurde jedoch erhalten, falls die Konzentrationen des Hintergrundelektrolyten und Mizellarpuffer so eingestellt wurden, daß die EOF - Geschwindigkeit in beiden Zonen identisch war [Nelson et al., 1996 b].

Weiterhin spielt die Flüchtigkeit des Mediums für die Detektionssensitivität eine wichtige Rolle. Indem nichtwässrige Lösungsmittel eingesetzt werden, in denen sich ebenso flüchtige Salze wie Ammoniumacetat befinden (nichtwässrige CE), kann ein Verlust in der Elektrosprayeffizienz und Ionenquellenkontamination vermieden werden [Yang, Lee, 1997].

NACE-ESI-MS hat gegenüber PF-MEKC-ESI-MS Vorteile; es müssen keine schwerflüchtigen Tenside beigemischt werden, die bei Eindringen ins MS die Signalintensität reduzieren können. Im wässrigem Medium kann Selektivität nur in den Medien erreicht werden, die eine Solvatisierung der Analyten ermöglichen [Morales und Cela, 1999]. Abhängig vom Lösungsmittel kann sich der pKa geladener Moleküle im nichtwässrigen Medium dramatisch verändern und Selektivität durch geeignete Säure-Base-Eigenschaften erhalten werden [Morales, 1999]. Das bedeutet, Moleküle die im wässrigen Medium (CZE-ESI-MS) aufgrund eines hohen pKa-Wertes nicht trennbar sind, können im nichtwässrigen Medium (NACE-ESI-MS) aufgrund eines verbesserten Säure-Base-Verhaltens (Definition nach Brönstedt) getrennt werden.

### **3.2 Analyse von polaren, organischen Substanzen mittels CE und CE-ESI-MS**

Zu Beginn der Doktorarbeit wurde am Beispiel der Agrochemikalien eine Literaturrecherche durchgeführt, um einen Überblick über die meist gebrauchten CE-Techniken, Extraktions- und Aufkonzentrierungsmethoden zu erhalten.

#### **3.2.1 Kenntnisstand über die Analyse von Agrochemikalien mittels CE und CE-ESI-MS**

Innerhalb dieser Arbeit haben wir uns auf Artikel konzentriert, die von Mitte der 1990er Jahre bis Mai 2002 über die Analytik von Agrochemikalien mittels CE und CE-ESI-MS veröffentlicht wurden. Die gesammelten Informationen wurden in Form der Tabelle 2 [Menzinger et al., 2000] dargestellt.

Standardlösungen 1.UV/Vis und LIF Detektion

Pesticide classes	Pesticides	Method	Electrolytes	Detection methods Detection limit (DL)	Ref.
Phenoxy acid  Pyrethroid	dichlorprop, mecoprop, 2,4-CPPA, 2,3-CPPA, 2,2-CPPA, 2-PPA, (silvex) chrysanthemic acid metabolites	CZE	250 mM phosphate, pH 6.5 50 mM NG (nonyl-β-D-glucopyranoside or 70 mM OG (n-octyl-β-D-glucopyranoside) review on chiral glycosidic surfactants	UV, λ =230 nm	[Mechref, El Rassi, 1997] [El Rassi, 2000]
s-Triazine	chloro-, hydroxy-, methoxy-, thiomethyl s-triazine	CZE	50 mM citrate-hydrochloric acid, pH 2.2	UV, λ =230 nm DL: 0.05 mg/l	[Schmitt et al., 1996]
Phenoxy acid	2,4D, MCPA	CZE  MEKC  CZE	a) 10 mM phosphate, 6 mM borate, pH 9.3, 50 % acetonitrile b) 10 mM phosphate, 6 mM borate, pH 9.3, 50 M sodium cholate, 35% acetonitrile c) 10 mM phosphate, 6 mM borate, pH 9.3 5 mM α-CD	UV, λ =200 nm  DL: 2,4-D: 0.15 mg/l MCPA: 0.15 mg/l	[Farran et al., 1999]
Imidazolinone, Phenoxy acid	imazaquin ,imazamethabenz, diclofop,	CZE	50 mM acetate, pH 3.6, 10 mM DM-β-CD,  10 mM TM-β-CD	UV, λ =214 nm DL: 10 mg/l	[Penmetsa et al., 1997 a]
Phenoxy acid	2.4-D, dichlorprop, mecoprop, fenoprop	CZE	50 mM acetate, pH 4.5; for enantiomers: idem + 25 mM TM-β-CD	UV, λ =230 nm DL: 0.05 mg/l	[Garrison et al., 1994]
Organophosphorus.  Phenoxy acid- methylester  Organochlorine	ruelene, isofenphos, dialifos,  fenamifos, malathion  fenoprop, mecoprop, dichlorprop-methyl ester  p,p`-DDT, p,p`-DDD o,p`- DDT, o,p`-DDD p,p`-DDE, o,p`-DDE metolachlor isomers: aS1`R, aS1`S, aR1R, aR1`S	MEKC  MEKC  MEKC  MEKC	a) 20 mM borate, pH 9,100 mM SDS, 40 mM DM-β-CD  b) 20 mM borate, pH 9,100 mM SDS, 60 mM γ-CD, 15 % methanol  c) 20 mM borate, pH 9, 50 mM SDS, 20 mM γ-CD, 20% acetonitrile  d) 20 mM borate, pH 9, 100 mM SDS (three of four isomers separated)	UV, λ =200 nm	[Schmitt et al., 1997]
Carbamate  Organophosphorus. s-Triazine	prophame, propoxur carbofuran, methyl-, ethyl - parathion, chlorfenvinphos atrazine, simazine, desmetryn	MEKC	5 mM borate, pH 8, 30 mM SDS	UV-Scanner: λ = 200-300 nm  DL: 0.08-0.13 mg/l	[Süsse, Müller, 1995]

Pyrethroid	permethrin, phenotrin, sanmarton, cypermethrin, fenprothrin  (with and without derivatization with ANDSA)	CZE	50 mM phosphate, pH 7.0	UV a) $\lambda = 200\text{nm}$ , b) $\lambda = 255\text{ nm}$ LIF $\lambda_{\text{ex}} = 325, 488\text{ nm}$  <i>DL underivatized:</i> UV $4,5 \times 10^{-5}\text{M}$ LIF $2,5 \times 10^{-5}\text{M}$ <i>DL derivatized:</i> UV $3,2 \times 10^{-5}\text{M}$ LIF $9,3 \times 10^{-5}\text{M}$	[Karcher, El Rassi, 1997]
s-Triazine	12 hydroxytriazines ametryn, atraton	MEKC	10 mM phosphate, pH 7.0, 50 mM SDS, ( 25 % isopropanol )	UV, $\lambda = 210, 230, 254\text{ nm}$	[Freitag et al., 1999] [Schmitt- Kopplin et al., 1997]
s-Triazine	ametryn, terbutryn, prometryn, simazine, atrazine, propazine	NACE	10 mM perchloric acid in 50 % (v/v) acetonitrile- methanol, 20 mM SDS	UV, $\lambda = 214\text{nm}$	[Carabias- Martinez et al., 1997]
Sulfonylurea	bensulfuron methyl, sulfometuron methyl, nicosulfuron, chlorsulfuron chlorimuron ethyl, thifensulfuron methyl, metsulfuron methyl,	CZE	25 mM acetate, pH 5, acetonitrile (3:1)	UV, $\lambda = 214\text{nm}$  <i>DL:</i> $4 \times 10^{-4}\text{ M}$	Matchett et al., 1996]
Phenoxy acid, Phenylurea	2,4-D, 2,4-DP, 2,4,5-T, 2,4-DB fenuron, monuron, diuron, monolinuron, linuron	MEKC	20 mM phosphate, borate pH 7, 0.07 M SDS	UV, $\lambda = 205\text{nm}$	[Farran, Ruiz, 1995 a]
Sulfonylurea	bensulfuron methyl, sulfometuron methyl, ethametsulfuron-methyl, tribenuron methyl, triasulfuron chlorimuron ethyl, nicosulfuron thifensulfuron methyl primisulfuron methyl, metsulfuron methyl, chlorsulfuron, amidosulfuron	CZE	50 mM acetate, pH 4.76, 1.86 mol/l acetonitrile	UV, $\lambda = 239, 220\text{ nm}$	[Berger, Wolfe, 1996]
s-Triazine, Phenoxy acid,	prometon propazine, prometryn silvex, 2,4,5-T, 2,4-D;	MEKC	a) 200 mM 1-butaneboronic acid, pH 10, 104 mM HG ( <i>Heptyl-<math>\beta</math>-D-Glucopyranoside</i> ) or	UV, a) s-triazine, phenoxy	[Smith, El

Urea	monuron, diuron, chloroxoron fluometuron, linuron, metobromuron, neburon,	MEKC	28mM DG ( <i>Decyl-β-D-glucopyranoside</i> ) b) 200 mM 1-butaneboronic acid -buffer , pH 11, 125 mM HG or 28mM DG	acid: λ = 231nm b) urea: λ = 240nm	Rassi, 1994 a]
s-Triazine	hydroxytriazines	CZE	50 mM acetate, pH 4.65	UV, λ = 214, 230nm	[Schmitt et al., 1995]
Phenoxy Acid	silvex-enantiomers; (troger`s base, dansylaminoacids)	MEKC	400 mM borate pH 10, 50 mM deoxy big CHAP(N,N-bis-(3-D-glucon- amidoprpyl)-deoxycholamide)	UV, λ = 240nm	[Mechref, El Rassi, 1996]
s-Triazine, Acetamide, Phenoxy acid, Sulfurcarbamate Organophosphorus	prometon, prometryn, propazine butachlor; silvex, 2,4,5-T; aldicarb; diazinon	MEKC MEKC	a) 125 mM borate, pH 10, 100 mM MEGA 8 (Octanoyl-N-methyl-glucamide) b) 125 mM borate, pH 10, 50 mM MEGA 10 (decanoyl-N-methylglucamide)	UV, λ = 240nm	[Smith et al., 1994 b]
Quaternary Ammonium	paraquat, diquat, difenzoquat	CZE	10 mM acetate, pH 4, 100 mM sodiumchloride	UV, λ = 205nm	[Galceran et al., 1994]
Phenylurea, Phenoxy acid	diuron, fenuron, linuron, mono- linuron, monuron; dichlorprop, 2,4-D, 2,4,5-T, 2,4-DB	MEKC	20 mM phosphate, pH 7, 50 mM SDS, 50 mM n-heptanol or 4.59 M methanol	UV, λ = 205nm	[Farran, Ruiz, 1995 b]
Urea, s-Triazine, Phenoxy acid, Sulfurcarbamate Organophosphorus.	monuron, diuron, fluometuron, siduron, metobromuron, linuron, neburon, chloroxuron  prometon, propazine, prometryn silvex, 2,4,5-T, 2,4-D; parathion; aldicarb	MEKC MEKC	a) 200 mM borate, pH 10, 100 mM OS (OM, OG, MEGA-9) (OM: <i>octyl-β-D-maltopyranoside</i> OS: <i>n-octanoylsucrose</i> OG: <i>octyl-β-D-glucopyranoside</i> MEGA 9: <i>nonanoyl-N-methyl- glucamide</i> ) b) 200 mM borate, pH 10, 100 mM OG (OM, OS, MEGA-9)	UV, λ = 240nm	[Smith et al., 1994 c]
Triazole	triadimenol	MEKC	a) 200 mM borate / 20 mM phosphate, pH 9.1, 0.05 mM SDS, b) 20 mM Hydroxypropyl-β-CD (enantiomers) 20 % methanol	DAD, λ = 220nm	[Williams, Trenerry, 1996]
Phenoxy acid	dicamba, 2,4,5-T, 2,4-D, Silvex dichlorprop, MCPP, MCPA, 2,4-DB	CZE	19 mM phosphate buffer  pH 2.9, 0.75mM hexamethonium-hydroxide (reversed-EOF)	UV, λ = 230nm	[McLaughlin et al., 1996]
Phenoxy acid	MCPA, 2,4-D, MCPB, dicamba mecoprop, dichlorprop	CZE	75 mM acetate, pH 4	UV, λ = 230nm	[Spagone et al., 1996]
Carbamate	carbofuran, phendipham,	MEKC	10 mM disodiumtetraborate, 10 mM boric acid	UV, λ = 254 nm[	

Phenylurea,	diuron, chlortoluron, fenuron, isoproturon, linuron, monuron methabenzthiazuron, metoxuron metobromuron, monolinuron		a) + 80 mM SDS b) + 20 mM SDS with each 3 M urea c) + 20 mM SDS without urea		[Pyell, Bütchorn, 1995]
-------------	--	--	--	--	-------------------------

## Standardlösungen 2. ESI-MS-Detektion

Pesticide classes	Pesticides	Method	Electrolytes	Detection methods Detection limit (DL)	Ref.
s-Triazine	simazine, atrazine, propazine, ametryn, prometryn, terbutryne, simetryn; prometon	CZE	50 mM acetate, pH 3.85, 0.7 mM cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) for reverse EOF	UV, $\lambda = 230\text{nm}$ ; ESI-MS	[Tsai et al., 1998]
Phenoxy acid	dichlorprop, fenoprop, mecoprop	CZE	50 mM acetate, pH 4.6, 20 mM TM- $\beta$ -cyclodextrin	UV, $\lambda = 230\text{ nm}$ ESI-MS	[Otsuka et al., 1998]
s-Triazine	atrazine, propazine, ametryn, prometryn	MEKC	20 mM acetate, pH 6.8 , 25 mM SDS	UV, $\lambda = 226\text{ nm}$ ; ESI-MS	[Nelson et al., 1996 b]
Phenoxy Acid	MCPP, 2,4-DP, 2,4-D, MCPA	CZE,	10 mM acetate, pH 4.8	ESI-MS	[Nielen, 1995]
Quaternary Ammonium	chlormequatchloride, choline chloride, trimethylamine-hydrochloride, trimethylvinyl-ammoniumchloride	CZE	10 mM creatinine, pH 3.6	Indirect-UV, $\lambda = 200\text{nm}$ ESI-MS  <i>DL: 5 mg/l</i>	[Wycherley, 1996]
s-Triazine	atrazine, desethylatrazine, desisopropylatrazine, simazine	MEKC MEKC	a) 10 mM acetate, pH 7, 10 mM SDS b) 10 mM acetate, pH 5.9, 10 mM SDS	a) UV, $\lambda = 226\text{nm}$ b) ESI-MS	[Yang et al., 1997]
Quaternary Ammonium	paraquat, diquat	CZE	5 mM electrolyte ( sodium acetate; ammonium-bicarbonate; ammonium acetate; ammonium formate, ammonium citrate), 0,5-1,5% acetic acid, pH 3.9, in 50 % (v/v) methanol-water	UV, $\lambda = 210\text{ nm}$ ESI-MS	[Song, Budde, 1996]

## Realproben 1. UV/Vis und LIF Detektion

Pesticide classes	Pesticides	Method	Electrolytes	Detection method and limit (DL)	Matrix analysed, extractions	Ref.
s-Triazine, Acetamid, Phenoxy acid	atrazine, simazine, alachlor, metolachlor dicamba, 2,4-D,	MEKC MEKC	a) 10 mM phosphate pH 9.0, 30 mM SDS, 8% methanol b) 10 mM borate pH 9.2, 30 mM SDS, 5mM Brij35	UV: $\lambda = 214\text{ nm}$ <i>DL UV:</i> triazines: 0.1 $\mu\text{g/l}$ alachlor: 1.0 $\mu\text{g/l}$	pond-water: LLE with methylenechloride	[Penmetsa et al., 1996]

Sulfonylurea	chlorimuronethyl: * after derivatization with BMC (4-bromo-methyl-7-methoxy-coumarin) *after derivatization with dansylchloride	MEKC	c) 10 mM phosphate pH 9.0 30mM SDS	LIF: $\lambda_{ex}$ =325 nm dicamba, 2,4-D, chlorimuronethyl DL LIF: 10 ng/l	deionized water: SPE with ethylacetate, ethylacetate:methylene- chloride (1:1, v/v), methylenechloride	
Quaternary ammonium	paraquat, diquat, difenzoquat, chlormequat (cq) mepiquat (mq)	CZE	10 mM 1-(4-pyridyl)- pyridinium chloride-HCL (PP), pH 2.5, 10 %methanol	indirect UV, $\lambda = 205, 257$ nm DL: 0.8 $\mu$ g/l for mq, cq	tap water	[Galceran et al., 1997]
Organonitrogen	hexazinone and meatabolites C,A1, E, B,D; (atrazine as internal standard)	MEKC	12 mM sodiumphosphate 10 mM sodiumborate pH 9, 50mM SDS, 15% methanol	DAD, hex.,A1: (247 nm) C (230 nm), B,D (225 nm), atrazin E (220nm)	groundwater SPE with methylene chloride	[Kubilius, Bushway, 1998]
Phenoxy acid	2,4-D, 2,4-DB, 2,4-DP, 2,4,5- TP, MCPA, MCPB, 2,4,5-T, MCPP, derivatized with 5-(amino- aceto-amido)-fluorescein	MEKC	39 mM phosphat, pH 6.5, 1670 mM urea, 46 mM SDS, 22.2 % methanol	LIF, $\lambda_{ex}$ = 488 nm  DL 2 fg for 4 nl- injection	distilled water, SPE with methanol	[Jung, Brumley, 1995]
Quaternary ammonium	paraquat, diquat	CZE	100 mM phosphate, pH 4.0 10% acetonitrile	DAD, $\lambda$ =258, 310 nm DL: 0.25-0.36 nM	herbicides in water, soil, potatoes, urine serum	[Perez-Luiz et al., 1996]
s-Triazine	atrazine, terbutylazine, desethylatrazine, desisopropylatrazine desethylterbutylatrazine hydroxyatrazine (HA), ameline hydroxyterbutylazine (HT) desethylhydroxyat. (DEHA) desisopropylhydroxyat.(DIHA)	CZE  MEKC  +GC/MS	a) 100 mM acetate, pH 4.6 10% methanol for OH- triazines  b) 30 mM borate, pH 9.3 30 mM SDS	UV, $\lambda$ =210nm DL CZE: DIHA, DEHA, ameline 0.2 mg/l HA,HT 0.5 mg/l DL SPE-CZE: 0.5- 1.25 $\mu$ g/l for 200 ml sample	tap-water, river-water, s-triazine-contaminated groundwater  SPE (LiChrolut EN) with methanol - acetone (3:2, v/v)	[Loos, Niessner, 1999]

Phenoxy acid, Phenylurea, s-Triazine, Carbamate, Organophosphorus.	2,4-D, 2,4,5-T, diuron, atrazine, simazine, terbutryn dimethoate, azinphos methyl, chlorpyrifos methyl chlorpyrifos ethyl, carbaryl	MEKC  MEKC	a) 20 mM phosphate, pH 7, 50 mM SDS, 20mM borate 8,8% n-butanol b) pH 9, 50 mM SDS, 40% methanol	UV, $\lambda = 200, 225\text{nm}$	off-line-SPE (carbopack B with methylene- chlorid, methanol, 0.016 M KOH and C-18 with methanol) field amplified injection	[Farran et al., 1996]
Sulfonylurea	metsulfuron methyl thiofensulfuron-methyl, rimsulfuron, chlorsulfuron, tribenuron methyl	MEKC	25 mM phosphate, pH 6.15, 50 mM SDS	UV, $\lambda = 234\text{nm}$  <i>DL:</i> 0.02 mg/l, <i>DL rim., triben.:</i> 0.035 mg/l	wheat, barley, corn a) homogenisation with acetonitrile, extraction with n-hexane b) cleanup with cation exchange-SPE	[Krynitsky, Swineford, 1995]
Organophosphorus.	chlorpyrifos	CZE  +GC +HPLC	10 mM phosphate, 6 mM borate, 25% acetonitrile, 50 mM SDS or NADCh (sodiumdeoxycholate)	UV, $\lambda = ?$  <i>DL air sample:</i> 1 mg/m <sup>3</sup>	air, leaves, soil	[Guardino et al., 1998]
several Herbicides	acifluorfen (A), 2,4-D, bentazon (B), thifensulfuron-methyl (T), chlorimuron-ethyl (C) imazaquin (I),	CZE	50 mM acetate, pH 4.75	UV, $\lambda = 240\text{ nm}$ <i>DL:</i> [ng/g] A: 36, B: C:11, T: 11 2,4-D: 85, I: 52	soybeans  PLE, cleanup with LLE with n-hexane / SPE with C-18	[Nemoto, Lehotay, 1998]
Phenoxy acid	2,4-DB, MCPB, 2,4-DP, 2,4- D, MCPA 2,4,5-TP, 2,4,5-T	CZE	a) phosphate, pH 5.6, 2 mM $\alpha$ -CD b) phosphate, pH 5.6, 4mM $\alpha$ -CD/1mM $\beta$ -CD	UV, $\lambda = 200\text{ nm}$  <i>DL</i> <1 $\mu\text{g/l}$	lake-water  SPE with methanol	[Hsieh, Huang , 1996]
Phenoxy acid	foxtril™ formulation: dichlorprop, ioxynil, bifenoxy	CZE  CZE	a) 50 mM acetate, pH 4.65 b) 50 mM acetate, pH 4.65 +25 mM TM- $\beta$ -CD	UV, $\lambda = 230\text{ nm}$  <i>DL dichlorprop:</i> 0.05 $\mu\text{g/g}$ soil	foxtril™ and soil after application of foxtril™ extraction with acetonitrile/water/glacial acid (80/20/2); methylenechloride/	[Garrison et al., 1996]

					hydrochloric acid	
Benzimidazole	carbendazim (c), metalaxyl (m), propiconazole (p), vinclozolin (v)	MEKC	10 mM phosphate, pH 7 100 mM cholate, 10 % methanol	UV, $\lambda = 214$ nm <i>DL</i> : (m):10 $\mu\text{g/l}$ , (c):5 $\mu\text{g/l}$ (p):20 $\mu\text{g/l}$ , (v):5 $\mu\text{g/l}$	deionized water lake-water LLE (methylenechloride)	[Penmetsa et al., 1997a ]
Sulfonylurea, Acetamid, s-Triazine	linuron, metsulfuron, metolachlor, atrazine	MEKC MEKC	a) 50 mM borate, pH 8, 35 mM SDS, 10 % methanol b) 50 mM borate, pH 8, 22 mM SDS 10%methanol (metabolites)	UV, $\lambda = 214$ nm	tap water, drinking water SPE (methylenechloride)	[Dinelli et al., 1994]
Sulfonylurea	bensulfuron methyl, sulfmeturon methyl, triasulfuron, chlorsulfuron, flumetsulam, nicosulfuron, triflusulfuron methyl, chlorimuron ethyl, orsuluron, thifensulfuron methyl, primisulfuron methyl, metsulfuron methyl, halosulfuron methyl	CZE  +LC/MS	50 mM acetate, pH 4.75 12 % acetonitrile	UV, $\lambda = 240$ nm	marsh-water SPE-with methanol  cleanup with strong-ion exchange SPE on alumina SPE with 0.5% acetic acid in methylene-chloride	[Krynitsky, 1997]
Sulfonylurea	chlorsulfuron, tribenuron, metsulfuronmethyl, bensulfuron, triasulfuron, chlorimuron, rimsulfuron, ethametsulfuron, CGA 152'005	MEKC	50 mM borate, pH 8.0, 22 mM SDS, 10 % methanol		distilled water	[Dinelli et al., 1995 a]
Phenoxy acid	2,4-D, dicamba	MEKC	50 mM borate, pH 8.3, 25mM SDS	UV, $\lambda = 254$ nm <i>DL</i> : ca. 0.6 pg	crops (sugar cane, rice, corn) treated with 2,4-D and dicamba SFE with CO <sub>2</sub> /acetone, cleanup: LLE with diethylether	[Lancas et al., 1999]
Phosphonic acid	glyphosphate, aminomethylphosphonic acid (AMPA)	CZE	10 mM phthalate, pH 7.5, 0.5 mM TTAB	indirect UV, $\lambda = 240, 350$ nm <i>DL</i> :0.01 $\mu\text{M}$ (2ng/nl)	milled wheat stacking from water, field-amplified injection	[Cikalo et al., 1996]

Diorganotin (DT) Triorganotin (TT)	trimethyltin (TMT), triethyltin (TET), tripropyltin (TPT), tributyltin (TBT), triphenyltin (TPhT),	CZE	a) 5 mM acetate, pH 4.5, 4 mM 4-aminopyridine (4-AP)	Indirect UV, $\lambda = 261 \text{ nm}$ <i>DL (TT):</i> 2 $\mu\text{M}$	sea-sand standard reference material (SRM)	[Whang et al., 1997]
		CZE	b) 5 mM acetate pH 4.5, 4 mM 4-aminopyridine (4-AP), 15 mM $\alpha$ -CD	<i>DL (DT):</i> 10-20 $\mu\text{M}$	PACS-1 from national research council of Canada (NRCC, Ottawa, Canada)	
Sulfonylurea	chlorsulfuron, chlorimuron, metsulfuron	MEKC	30 mM borate, pH 7.0, 80 mM SDS, 14 % methanol 20% isopropanol	UV, $\lambda = 214 \text{ nm}$ <i>DL:</i> 10 ng/l	soil SPE with methanol water (1:1, v/v)	[Dinelli et al., 1995 b]
Sulfonylurea	primisulfuron, triasulfuron	CZE	25 mM phosphate, pH 6.5, 50mM lithiumdodecyl-sulfate	UV, $\lambda = 214 \text{ nm}$ <i>DL:</i> 0.2 mg/l (primisulfuron) 0.1 mg/l (triasulfuron)	deionized water, lake water, soil a) extraction with methylenechloride b) extraction with methanol-phos-phate (1:1) and methylenchloride	[Penmetsa et al., 1997 b]
Carbamates Organophosphorus, s-Triazines, Phenoxy acid, Phenylurea	prophame, carbofuran, parathionethyl, chlorfenviphos, simazine, desmetryn, 2,4-D, diuron	MEKC	5 mM borate, pH 8.0, 30 mM SDS	UV, DAD $\lambda = 190-365 \text{ nm}$ <i>DL in ng/ml:</i> 2,4-D 0.08 Diuron 0.08 Prophame 0.02 Atrazine 0.014 Parathionethyl 0.04	drinking water SPE with methanol combined with sample stacking	[Süsse, Müller, 1996]
s-Triazine	atrazine, cyanazine, simazine, propazine, ametryn, prometryn, terbutryn	MEKC	60 mM borate pH 9.2, 50 mM SDS	UV, $\lambda = 214 \text{ nm}$ <i>DL:</i> 0.05 $\mu\text{g/ml}$ <i>DL (SPE)</i> 0.2 ng/ml	water SPE with methanol	[Carabias-Martinez et al., 1996]
Triorganotin	trimethyltin (TMT), triethyltin (TET), tributyltin (TBT) tripropyltin (TPT)	CZE  +HPLC	20 mM tartratic acid, 20 % methanol, 4 mM BTAC, pH 2.6	UV, $\lambda = 220 \text{ nm}$ <i>DL:</i> TMT: 0.16 mg/l TET: 0.24 mg/l TBT: 0.29 mg/l TPT: 0.009 mg/l	SPE (XAD-2) with methanol	[Pobozy et al., 1995 ]

several Herbicides	tribenuron, chlorsulfuron, metsulfuron, paraquat, simazine, atrazine, linuron, terbuthylazine, metolachlor, alachlor, trifluralin	MEKC	30 mM borate, pH 8.0, 30 mM SDS	UV, $\lambda = 214 \text{ nm}$		Dinelli et al., 1996 ]
Organonitrogen	metribuzin, bromacil, terbacil, hexazinone, DEET, triadimefon	MEKC	12.5 mM borate, pH 9, 50 mM SDS	UV, $\lambda = 210 \text{ nm}$ DL: 0.8 ng/l (without DEET)	drainage ditch water near a highway after rainfall a) off-column-SPE: with acetonitrile b) on-column-FAC: with 1.2 mM borate, 5 mM SDS (10-fold diluted buffer)	[He, Lee, 1997]
Phenoxy acid	mecoprop, fenoprop, dichlorprop, flamprop haloxyfop, fluazifop, diclofop, fenoxaprop	CZE	75 mM britton-robinson-buffer (boric-, acetic-, phosphoric-acid), pH 5, 6 mM vancomycin	UV, $\lambda = 190-210 \text{ nm}$ <i>DL per enantiomer:</i> $5 \times 10^{-7} \text{ M}$	soil and gallant <sup>TM</sup> , 72 h incubation at room temperature, extraction with methylenchloride	Desiderio et al., 1997 a]
Several Herbicides	naproamide, flampropisopropyl bromacil, chlorbufam, imazapyr, flamprop acid, fluazifop acid, haloxyfop acid, ethofumesate	CZE	25 mM borate, pH 9, 20-80 mg/ml SBE- $\beta$ -CD	UV, $\lambda = 205 \text{ nm}$	commercial formulation effix <sup>TM</sup>	[Desiderio et al., 1997 b]
Rotenticide	sodium monofluoroacetate	CZE (reverse EOF)	a) 5 mM phthalate, pH 4.61, 0.3 mM CTAB b) 5mM 4-hydroxybenzoate pH 9.49, 0.3mM CTAB	Indirect UV, a) $\lambda = 230 \text{ nm}$ c) $\lambda = 249 \text{ nm}$ DL: 0.4 $\mu\text{g/ml}$	rotenticide bait	[Guan et al., 1996]
Antibiotic Fungicide	blasticidin S	CZE	67 mM phosphate, pH 7	UV, $\lambda = 265 \text{ nm}$ DL: 0.2 $\mu\text{g/ml}$	commercial formulated blasticidin S	Lo et al., 1995]
Phenylurea	monuron, linuron, diuron, isoproturon, monolinuron	MEKC	4 mM borate, 12 mM phosphate, pH 7, 30 mM SDS	UV, $\lambda = 244 \text{ nm}$ DL: diuron 0.02ng/ml others 0.04 ng/ml	water SPE with acetone	[Barroso et al., 1999]
Carbamate, Thiocarbamate, Dithiocarbamates	methomyl, aldicarb, asulam, thiophanate-methyl, cabaryl, swep, formetanate, molinate, ethiofencarb, cycloate, thiram	MEKC	100 mM borate pH 8.2, 50 mM SDS, 10 % methanol	UV, $\lambda = 230 \text{ nm}$ DL: carbaryl and asulam: 1-38 ng/ml cycloate 158 ng/ml	tap-water SPE with acetonitrile	[Rossi, Rotilio, 1997]
	glyphosphate, glufosinate, aminomethylphosphric acid:	CZE	1 mM fluorescein, pH 9.5	LIF: Excitation: 488 nm, Collecting: 520	Commercial formulation:	[Chang, Liao, 2002]

				nm; Concentration <i>DL</i> : Between 0.6 and 1.7 $\mu\text{M}$	Ninnichun, basida	
„Quats“	paraquat, diquat, difenzoquat	CZE (reverse EOF)	50 mM acetic acid- ammonium acetat, pH 4.0, 0.8 mM CTAB + 5% methanol	Millipore water: < 0.3 $\mu\text{g/l}$ ; Drinking water samples: < 2.2 $\mu\text{g/l}$	SPE and sample stacking; Tap water (Barcelona), mineral water	[Nunez et al., 2002]
phenylurea	Monuron, isoproturon, diuron	Reverse MEKC	50 mM SDS, 50 mM phosphoric acid, 15 mM $\gamma$ - CD	<i>DL</i> : isoproturon: 17 ppb, diuron: 30, monuron: 10 ppb	Reverse migrating micelles on-line preconcentration: Spiked Tap and pond water	[Quirino et al., 2000]

Realproben: 2. ESI-MS-Detektion:

Pesticide classes	Pesticides	Method	Electrolytes	Detection method and limit (DL)	Matrix analysed, extractions	Ref.
Several Herbicides	bentazon, dinoseb, chloramben, 4-nitrophenol, acifluorfen, pentachlorphenol, dicamba, picloram, dichlorprop, 2,4-D, 3,5 dichlorbenzoic acid, 2,4,5-TP, 2,4-DB acid	CZE	a) 20 mM phosphate, pH 2.9 or 6.4 b) 5 mM acetate in i-prop./ water (40/60), pH 10	a) UV, $\lambda = 230\text{nm}$ ; b) ESI-MS <i>DL</i> : 8-250 $\mu\text{g/l}$	drinking-water sample stacking	[Song, Budde, 1998]
	procymidone, thiabendazole	CZE	Formic acid-ammonium formate, pH 3.5 + 2 % methanol	ESI-MS <i>DL</i> :procymidone: 0.1 and thiabendazole: 0.01 $\mu\text{g/ml}$	apples, grapes, oranges, pears, strawberries, tomatoes ; SPE (C-8): Elution with dichlormethane	[Rodriguez et al., 2002]

### 3.2.1.1 Für die CE-Analytik von Agrochemikalien verwendete Proben

Nicht nur **kommerzielle Mischungen** wie Gallant: 125 g/l racemischer Haloxyfopethoxyethylester [Desiderio et al., 1997 a]), Effix : Flampropisopropyl R(-)-Isomer [Desiderio et al., 1997 b]), Blastocidin-S [Lo et al., 1995] oder Foxtril (racemisches Dichlorprop, Bifenox und Ioxynil) [Garrison et al., 1996], sondern auch **reale Umweltproben** wie Wasser [*Grund- und Flußwasser*: Dinelli et al., 1996; *Trinkwasser*: Song, Budde, 1998; Pietta et al., 1999; *Seewasser*: Smith und El Rassi, 1994, Spagone et al., 1996; *Leitungswasser*: Galceran et al., 1997; Loos, Niessner, 1999, Dinelli et al., 1994, Rossi, Rotilio, 1997; sowie *deionisiertes/destilliertes Wasser*: Jung, Brumley, 1995, Penmetsa et al., 1997, Dinelli et al., 1995 a, Dinelli et al., 1995 b, Dinelli et al., 1996], *Lebensmittel wie Reis* [Lancas et al., 1999], *Kartoffeln* [Perez-Luiz et al., 1996] oder *Sojabohnen* [Nemoto et al., 1998] sowie *Bodenproben* [Penmetsa et al., 1997, Perez-Luiz et al., 1996, Garrison et al., 1996, Desiderio et al., 1997, Lewis et al., 1999] wurden mittels CE untersucht.

Es ist besonders wichtig, die Einflüsse der Matrices auf die Wiederfindungsraten (während der Probenkonzentrierung) sowie auf die Signal-Rausch-Verhältnisse (während der Quantifizierung) der Pestizide vor einer Analyse der Realproben zu bestimmen. Deshalb wurden die verschiedenen Umweltproben nach „Spiken“ mit den zu untersuchenden Pestiziden analysiert.

### 3.2.1.2 Extraktions-und Aufkonzentrierungstechniken

Off-line und on-line Aufkonzentrierungsmethoden wurden in der Literatur beschrieben; im folgenden sollen diese kurz erläutert werden.

**Off-line:** *Flüssig-flüssig-Extraktion*, die älteste angewandte Methode mit des öfteren u.a. nicht zufriedenstellenden Wiederfindungen.

Die *Extraktion mit superkritischen Flüssigkeiten* (hauptsächlich CO<sub>2</sub> und andere mögliche Lösungsmittelzusätze) benötigte in manchen Fällen eine ziemlich lange Zeit, da dazwischengeschaltete Wasch- und Trocknungsschritte einbezogen werden mussten [Penmetsa et al., 1997 b].

Die *druckunterstützte Flüssigkeitsextraktion (PLE)* ist eine relativ neue Technik, die ähnlich zur Flüssigkeitsextraktion erhöhte Temperaturen und Druck anwendet, um die Extraktion zu beschleunigen. PLE wurde ursprünglich für die Probenvorbereitung in der Umweltanalytik entwickelt und für die Extraktion von Heilpflanzen angewendet [Benthin et al., 1999]

Eine weitere Aufkonzentrierungsmethode ist die *Festphasenextraktion (SPE)*, die die wichtigste off-line Maßnahme darstellt. Die Sorbentien sind in den allermeisten Fällen nicht-polare C-18 Materialien, an denen die Analyten durch hydrophobische Wechselwirkungen getrennt werden [Majors, 1998]. Mitextrahierte Substanzen (von den Matrices) können in der Trennung/Detektion mit den Analyten interagieren [Bjarnason et al., 1999].

**On-line:** Weiterentwickelte on-line Aufkonzentrierungsmethoden sind u.a. *on-line SPE, Membran unterstützte Probenvorbereitung, Sample Stacking und Sweeping in MEKC*..

*On-line SPE* von Triazinherbiziden mit C-18- Packungsmaterialien wurden schon 1992 von Cai und El Rassi beschrieben [Cai, El Rassi, 1992]. Im Umweltsektor wurde die Analyse von der kationische Droge Terbutalin mit einer Aufkonzentrierung von 7000 x beschrieben [Petersson et al., 1999]. Sogar komplexe Peptidmischungen wurden erfolgreich untersucht [Figeys et al., 1997] Automatisch durchgeführte on-line SPE-CE ermöglichte eine 12 fache Anreicherung von s-Triazinen aus angereichertem Wasserproben bis zu 50 µg/l [Hinnsman et al., 2000].

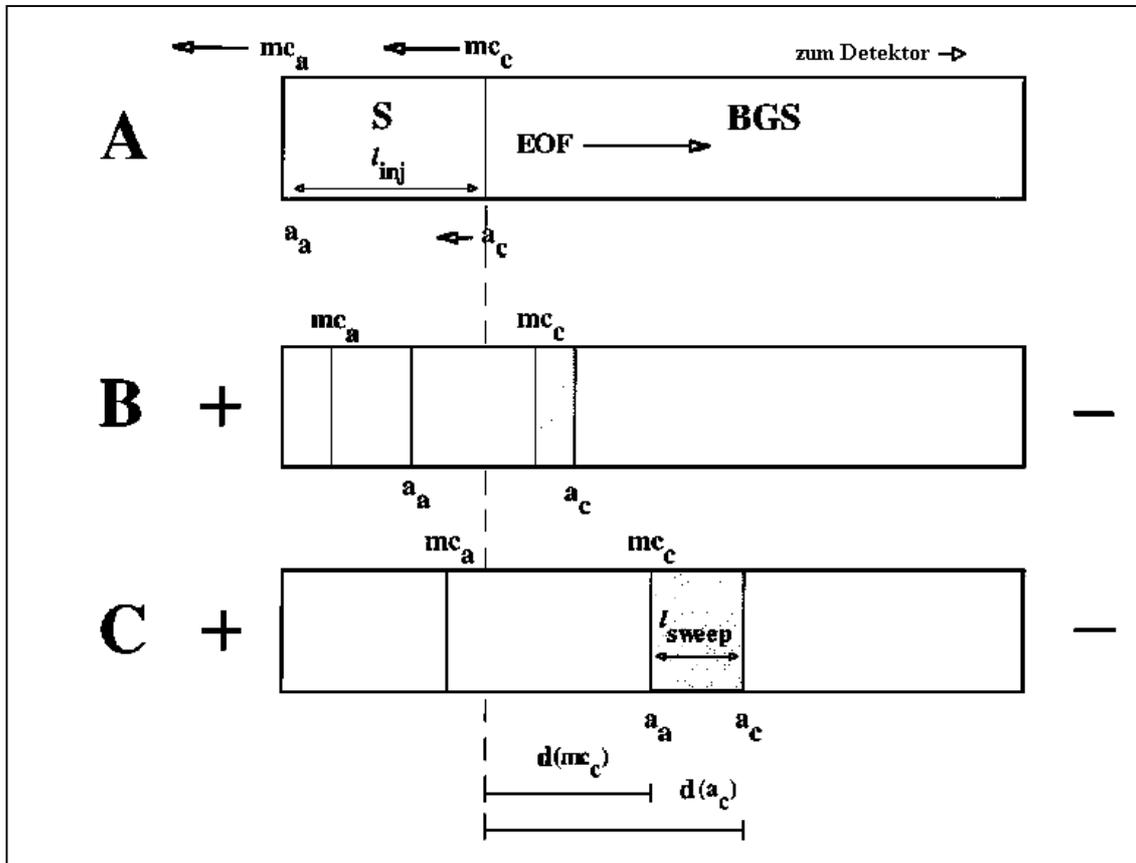
Die *Membran-Extraktion und –Aufkonzentrierung* wurde in der Literatur beschrieben [van de Merbel, 1999]. Hier wird eine poröse Membran mit einem mit Wasser nicht mischbaren, organischen Lösungsmittel imprägniert oder die Membran besteht aus nichtporösen Silikon. Der pH ist ein wesentlicher Parameter; er muß an der „Donor-Seite“ so eingestellt werden, daß die Analyten ungeladen sind und leicht in die Membran extrahiert werden können. An der „Akzeptor-Seite“ muß ein pH gefunden werden, der die Ionisation der Probenmoleküle ermöglicht. Die Analytmoleküle dürfen nicht in die Membran rückmigrieren. Das Trennprinzip basiert auf Größenausschluß [van de Merbel, 1999]. Im Umweltbereich wurde diese Technik für die Analyse von Phenoxy Säuren, Sulfonylharnstoffen, Triazinen und anderen ionisierbaren Herbiziden angewendet [van de Merbel, 1999].

„*Sample Stacking*“ findet in der Kapillaronenelektrophorese (CZE) Anwendung. Hierzu wird eine große Menge einer 1:10 verdünnten Probe in die Kapillare elektrokinetisch oder hydrodynamisch injiziert [Farran et al., 1996]. Das Prinzip der Aufkonzentrierung beruht darauf, daß im verdünnten Puffer oder Wasser das elektrische Feld stärker ist als im Puffer. Wenn Spannung angelegt wird, wandern die anionischen Analyten („Normalmodus“: Anode⇒Kathode, “reversed polarity“ Kathode⇒Anode) zu der Grenze Wasser (oder verdünnter Puffer) und dem Trennpuffer. Wenn also die Analyten dieses „Interface“ erreichen, verlangsamen sich die Ionen und werden in einer scharfen Probenbande aufkonzentriert [Farran et al. , 1996].

*On-line Sweeping* in MEKC ist die Weiterentwicklung der sogenannten „sample stacking“-Technik für neutrale Analyten (vgl. oben). Die Detektionssensitivität für sowohl geladene als auch neutrale Komponenten kann signifikant verbessert werden, indem geeignete Sweeping-Bedingungen gewählt werden [Quirino, Terabe 1999]. Die Methode ermöglicht schärfere Probenzonen, bis zu einer 5000-fachen Aufkonzentrierung (!) von verdünnten Proben. Dieser hohe Aufkonzentrierungsfaktor kam durch einen unrealistischen Vergleich der aufkonzentrierten (ca. 0.265 ppm) mit einer nicht aufkonzentrierten Probe (ca. 190 –270 ppm) zustande.

Nur durch Verwendung mit dieser on-line Aufkonzentrierungstechnik konnte in Seewasser Fenoprop bis unter 10 ppb nachgewiesen werden [Quirino, Terabe 1998].

Die folgende Abbildung 6 erklärt das Prinzip des Sweeping in MEKC (wichtig für Abschnitt 4.1.4 ff).



**Abb. 6:** Sweeping von neutralen Analyten unter dem Einfluß eines hohen EOF. A) Start: Injektion von S (Mizellarpuffer mit gleicher Konduktivität wie Hintergrundelektrolyt), darin wird hydrodynamisch die Probe injiziert (länger als üblich: z.B. 150 sec statt 15 sec), B) Anlegen von Hochspannung (Normalmodus): Mizellen der kathodischen Seite „sweepen“ Analytmoleküle. Dieses Andocken basiert auf dem Grundprinzip der MEKC: Je hydrophober ein Analyt, desto stärker bindet er an den apolaren Innenteil der SDS-Mizellen. C) Die injizierte Analytenzone ist vollständig „gesweept“ und wandert zum Detektor.

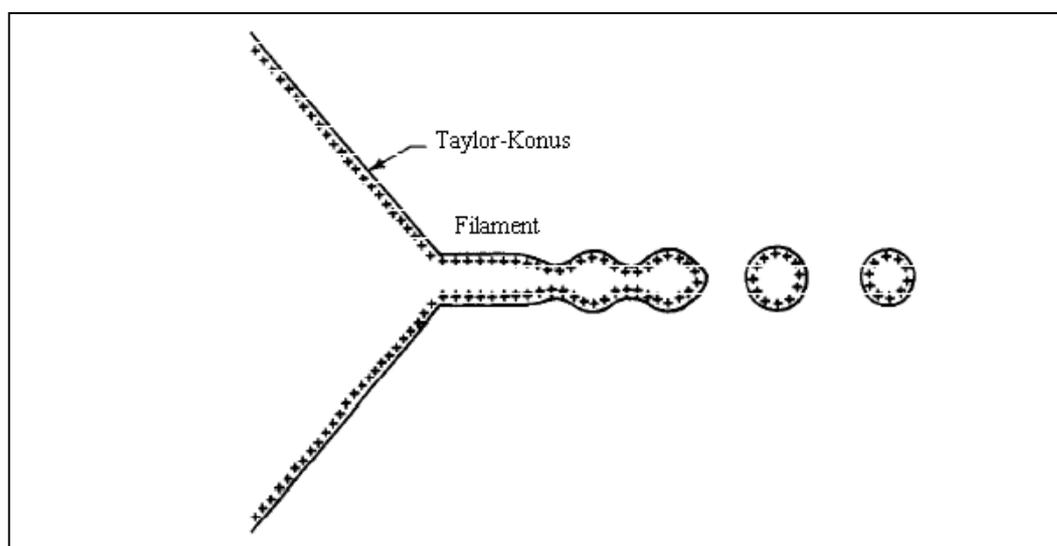
Erläuterungen:  $mc_a$ ,  $mc_c$  = Mizellen der anodischen und kathodischen Seite,  $a_a$ ,  $a_c$  = Analyten der anodischen bzw. kathodischen Seite,  $d(mc_c)$  = Distanz der gewanderten kathodischen Mizellen zur Ursprungsstellung (A),  $d(a_c)$  = Distanz der kathodisch gewanderten Analyten zum Ursprung (A). [Abbildung nach Quirino et al., 2000]

### 3.3. Elektrospray-Ionisation (ESI)

#### 3.3.1 Allgemeine Grundlagen

Der Begriff des „Elektrospray-ESI“ basiert auf den Arbeiten von Dole [Dole et al., 1968] und wurde durch Fenn und Yamashita 1984 etabliert [Fenn, Yamashita, 1984]. Der Elektrospray-Prozess gehört zu den weichen, homogenen Ionisationsmethoden und wurde zu einer der wichtigsten Ionisationstechniken für die on-line Kopplung von flüssigkeitschromatographischen [Whitehouse et al., 1988] sowie kapillarelektrophoretischen Methoden [Martin-Girardeau und Renoud-Gonnord, 2000] mit einem Massenspektrometer (MS)

Prinzipiell werden im ESI-MS die Analytmoleküle, die in Lösung vorliegen, unter dem Einfluß einer Hochspannung ( i.d.R. zwischen + 3 und +6 kV im Positivmodus zur Detektion von Kationen) sowie (wie im Falle des meist verwendeten pneumatisch unterstützten Elektrospray) eines Stickstoffstromes aus einer Stahlkapillare versprüht, wobei zunächst kleine geladene Tröpfchen entstehen (1.Schritt: Bildung geladener Tröpfchen). Genauer betrachtet, wenn die elektrostatische Abstoßung der Ladungen größer als die Oberflächenspannung der aus der Stahlkapillare ausströmenden Flüssigkeit ist, expandiert die Flüssigkeit zu einem Konus (Taylor-Konus). Am letzten äußeren, stabilen Punkt verlängert sich der Konus zu einem Filament. Aus diesem Filament entstehen individuell elektrisch geladene Tröpfchen, die in die Gasphase emittiert werden (Abb. 7).



**Abb. 7:** Ausbildung des Taylor-Konus, Filament und Austreten geladener Tröpfchen [Abbildung nach Kebarle, 2000]

Die elektrische Feldstärke, die zwischen der Spray-Kapillare und der Gegenelektrode auf die zu versprühende Flüssigkeit einwirkt kann folgendermaßen ausgedrückt werden:

$$7) \quad E_c = \frac{2V_c}{r_c * \ln\left(\frac{4d}{r_c}\right)}$$

Mit  $V_c$  = Spannungsdifferenz zwischen Spray-Kapillare und der Gegenelektrode (heated capillary, vgl. Ausführungen über Aufbau CE-ESI-MS, Abschnitt. 6.2),  $r_c$  = Radius der Spray-Kapillare und  $d$  = Distanz zwischen Spray-Kapillare und Gegenelektrode.

Erreicht der Radius der Tröpfchen das sogenannte „Rayleigh-Limit“, also die maximale Ladungsmenge auf einem Tröpfchen, dann zerfallen die Tröpfchen wegen der Abstoßungskräfte zwischen gleichnamigen Ladungen zu kleineren Tröpfchen (2.Schritt: Verkleinerung, „Schrumpfen“ der Tröpfchen). Dieses Phänomen kann mathematisch mit der Rayleigh-Gleichung beschrieben werden.

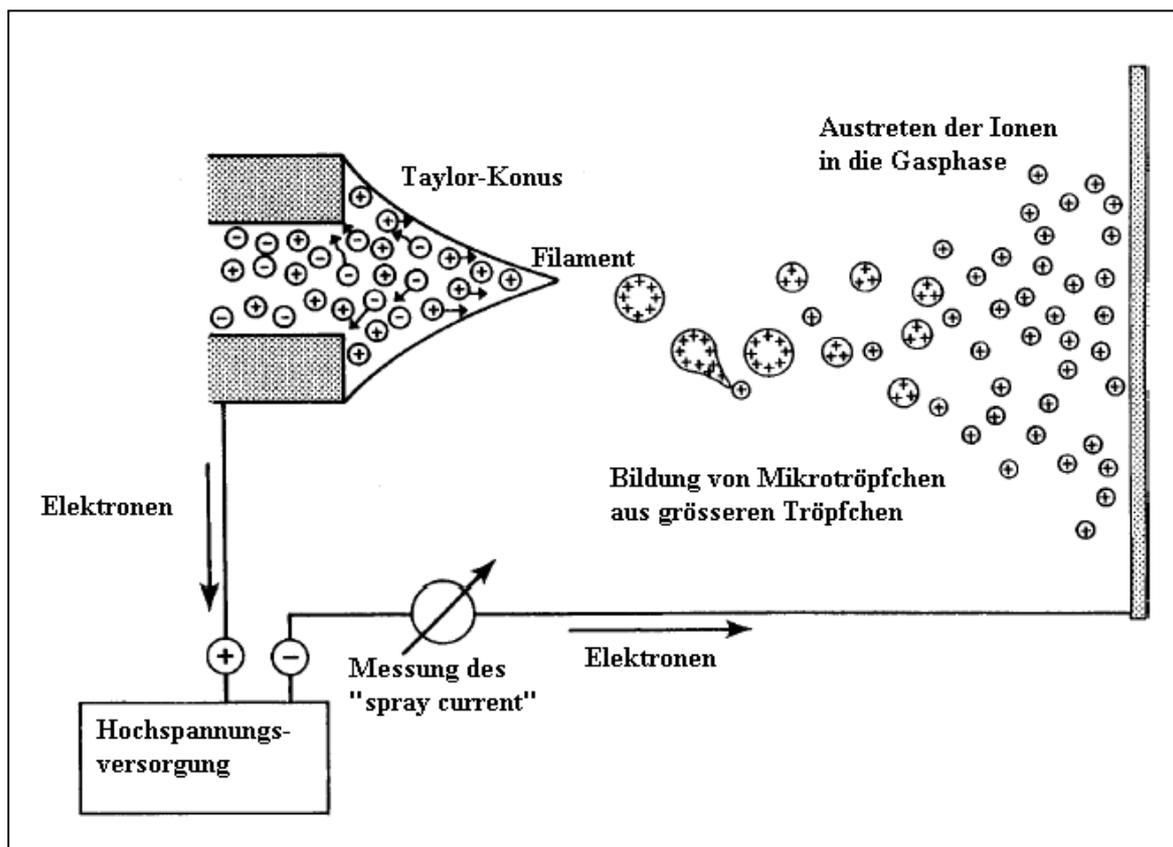
$$8) \quad Q^2 = 64\pi^2 * E_0 * \gamma * R^3$$

Worin bedeuten:  $Q$  = Ladung [Coulomb],  $\gamma$  = Oberflächenspannung,  $E_0$  = Dielektrizitätskonstante im Vakuum,  $R$  = Radius [m]. Im folgenden kommt es zur Bildung gasförmiger Ionen (3. Schritt).

Abbildung 8 gibt einen zusammenfassenden Überblick über den Elektrospray-Prozeß, der alle drei Schritte der Ionenbildung vereint.

Im wesentlichen wurden zwei Modelle vorgeschlagen, um die Bildung gasförmiger Ionen aus geladenen Tröpfchen zu erklären.

Dole [Dole et al., 1968] entwickelte das Modell des geladenen Rückstands (charged residue model, CRM) und ging davon aus, daß aus extrem kleinen Tropfen (Radius  $r \approx 1$  nm), die nur noch ein Analytanion enthielten, durch Lösungsmittelverdampfung gasförmige Ionen entstanden.



**Abb. 8:** Der Elektrospray-Prozess: 3 wichtige Schritte: Bildung geladener Tröpfchen; Reduktion der geladenen Tröpfchen und Austreten der Ionen in die Gasphase; genauer Mechanismus: siehe Text. [Abbildung nach Kebarle, 2000]

Iribane und Thomson [Iribane, Thomson, 1976, 1979] zeigten das Ionenemissions-Modell (ion emission model, IEM). Hierbei erfolgte die Bildung gasförmiger Ionen aus hochgeladenen kleinsten Tröpfchen (Radius  $r \approx 8$  nm).

Diese Ionenemission aus Mikrotropfen steht bei IEM in Konkurrenz zum weiteren Rayleigh-Zerfall der Tropfen.

Der ESI-Prozess stellt eine weiche Ionisationsmethode dar, so daß selbst empfindliche Moleküle und teilweise sogar nichtkovalente Aggregate unzerstört in das Massenspektrometer gelangen können. Deshalb werden bei Molekülen mit einer molaren Masse  $< 1000$  Da typischerweise sogenannte Quasi-Molekülionen detektiert, die bei positiver ESI-Spannung durch Anlagerung, bei negativer ESI-Spannung durch Abstraktion eines Protons gebildet werden ( $[M+H]^+$  bzw.  $[M-H]^-$ ). Fragmentierungen werden wegen der sanften

Ionisationstechnik bei ESI nur mit sehr geringen Intensitäten beobachtet im Gegensatz zu anderen Ionisationsarten wie z.B. Elektronenstoß.

Mit der Elektrospray Ionisierung ist der massenspektrometrische Nachweis von hochmolekularen Verbindungen (z.B. Peptide, Proteine) möglich. Dies beruht auf der Generierung von vielfach geladenen bzw. protonierten Molekülonen („Dacheffekt“ ähnelt einer Boltzmann-Verteilung). Für den Ladungszustand des Analyten ist auch dessen räumliche Größe entscheidend [Fenn, 1993]. Je größer das Analytmolekül unter der Oberfläche des Mikrotropfens ist, desto mehr Ladungen wird er beim Austritt in die Gasphase mitnehmen, somit treten Moleküle bis < 1000 Da nur einfach geladen auf (s.o.), wobei Verbindungen mit einem Molekulargewicht >2000 Da ausschließlich mehrfach geladen sind.

Die folgende Tabelle 3 faßt wichtige Aspekte der Elektrospray-Ionisation zusammen.

Mechanistischer Effekt	Auswirkungen	Ref.
„Ion evaporation model“  „Charge residue model“  Electrospray als Elektrolyseeinheit	Direkte Emission von Ionen in die Gas-Phase  Produktion von „Gasphase-Ionen“ erst dann, wenn keine Verflüchtigung von Lösungsmittel mehr möglich ist  Elektrochemische Reaktion (Oxidation, wenn Pos.-Modus) an Spitze der Metallkapillare, Reduktion (Entfernen von pos. Ionen) an neg. Gegenelektrode	[Kebarle, 2000]
„Ion evaporation model“	Ladungszustand (LZ) der Gasionen spiegelt LZ der kondensierten Phase wider  Der Transfer von Ionen in die Gasphase ist kein energetischer Prozess (Desolvatierungsprozess „kühlt“ Ionen)  Schrittweise Spaltung nicht kovalenter Wechselwirkungen (typischerweise Desolvatierung)	[Gaskell, 1997]
„Ion evaporation model“	3 Schritte: Bildung elektrisch geladener Tröpfchen, Freisetzung von Ionen aus Tröpfchen, Transport von Ionen ins Vakuum des MS  ESI ist ein konzentrationssensitiver Detektor	[Bruins, 1998]

ESI = „electrolytic flow cell“	Redoxreaktionen verändern die Zusammensetzung der zu zerstäubenden Flüssigkeit	[Van Berkel, 2000]
ESI = „controlled-current electrolytic (CCE) flow cell“ „Ion evaporation model“ „Charge residue model“	Spannung an ESI-Nadel ist eine Funktion des ESI-Stromes, Redoxpotentials und der Konzentration der Lösung	[Cole, 2000]
Softness“ der Electrospray-Ionisation	Ionisierung von Makromolekülen ohne Spaltung von kovalenten Bindungen, schwache nicht kovalente Bindungen werden beibehalten	[Loo, 2000]
ESI-MS linearer Bereich (LDR): Grenzen: Signalunterdrückung bei hohen Analytenkonz. (>0.2 mM) „Cluster ion formation“	Limitierung durch „Ionen-Transmission“  Faktoren zur Ion/ Ionen-Paar Bildung (Cluster) nicht bekannt, aber: NaCl und NH <sub>4</sub> OAc bilden bei hohen Konzentrationen keine Cluster, CsI, NaOAc, NH <sub>4</sub> Cl und Quats (TAAX) dagegen schon	[Zook, 1997]
„Equilibrium partitioning model“	schließt Effekte von ionischen Gleichgewichtskonstanten (K) und Analyt/Elektrolyt-Konzentrationen mit ein  Voraussetzung: stabiler spray current	[Const. 2000]
„Continuum model for ion evaporation from a drop“	Dadurch kann Solvationsenergie eines Iones innerhalb des Flüssigkeitstropfens bestimmt werden	[Labo., 2000]
Applikation von ESI: Gepulster Electrospray	Brauchbar für Mikro ESI/MS zur Leistungssteigerung	[Lu, 2001]

**Tab. 3:** Weitere Aspekte der Electrospray-Ionisation

Eine wichtige Voraussetzung für den Electrospray-Prozess ist die mögliche Ionisation der Probenmoleküle. Polare Moleküle, die keine funktionellen Gruppen beinhalten, die durch Protonierung oder Deprotonierung ionisiert werden können, lassen sich für den Electrospray durch Assoziation mit anderen Ionen in Lösung (z.B. NH<sub>4</sub><sup>+</sup> oder Na<sup>+</sup>) ionisieren. [Bruins, 1998]. Apolare Substanzen, die nicht protoniert oder deprotoniert werden können, lassen sich

nicht durch den Elektrospray-Prozess ionisieren. Jedoch ist der Begriff „polar“ im Elektrospray in anderer Weise zu verstehen als einzig die Wasserlöslichkeit [Bruins, 1998]. Vielmehr hat eine „polare“ Verbindung eine hohe Tendenz, in der Gasphase zu protonieren oder zu deprotonieren.

Die gebildeten Quasi-Molekülonen besitzen kaum Anregungsenergie und können durch Beschleunigung und Stöße mit Gasmolekülen oder nach der Ionentrennung durch Gasstöße im MS zum Zerfall angeregt werden [Budzikiewicz, 1998]. Während der Transfer von Gasionen in Lösung ein natürlicher Prozeß ist, ist die Bildung von Gasionen aus einer Lösung (Ionen liegen hier solvatisiert vor) ein stark endothermer Vorgang. Tatsächlich ist die notwendige Energie, um eine C-C-Bindung zu brechen ( $85 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) kleiner als Ionen aus einer Lösung in die Gasphase zu bringen ( $106 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). [www.Geocities.com/CapeCanaveral/7716/esiitms.html].

Im Gegensatz zur chemischen Ionisation oder Elektronenstoßionisation verhält sich Elektrospray konzentrations sensitiv [Bruins, 1998]. Das Probensignal ist proportional zur Konzentration des Analyten, in der chemischen Ionisation und Elektronenstoßionisation ist das Analytsignal proportional zu der Anzahl der Moleküle pro Zeiteinheit, d.h. flußabhängig [Bruins, 1998].

Jedoch sind dem System Grenzen gesetzt. Bei einer zu hohen Analyt-Konzentration [Bruins:  $>10 \text{ }\mu\text{M}$ ], tritt eine Sättigung des Signals ein, die sich dadurch erklären ließe, daß die Oberfläche der Mikrotröpfchen voll von Analytionen ist. Es besteht also für weitere Ionen keine Möglichkeit, auf dem Tröpfchen Platz zu finden.

Die Bildung von geladenen Tröpfchen und ihre Konsistenz im Elektrospray sind die Basis der Ionenproduktion in einer ESI-Quelle [Olumee et al., 1998]. Wichtig dabei ist hervorzuheben, daß die Ionenstärke und deshalb die Leitfähigkeit der zerstäubten Flüssigkeit sich signifikant ändert, wenn u.a. die Salzkonzentration der Probe erhöht wird. Das hat einen dramatischen Einfluß auf die Grössenverteilung der Tröpfchen und deren Verhalten entlang der Spray-Achse [Olumee, 1998]. Im Falle der Methanol-Wasser- (90:10) - Lösungen mit einer hohen Konduktivität, d.h. KCl wurde zugesetzt, nimmt der durchschnittliche Radius der erzeugten Mikrotröpfchen mit zunehmender Distanz von der Spray-Kapillare zu. In 90% Methanol, d.h.

ohne Salzzusatz, nimmt die Tröpfchengröße infolge von Lösungsmittelverdampfung ab. Wird jedoch die Form des Tröpfchens zu stark deformiert, d.h. die Salzkonzentration ist zu hoch, wird das gebildete Tröpfchen im Elektrospray instabil und reißt vorzeitig ab, was letztendlich in einem instabilen Spray resultiert.

### **3.3.2 Kopplung einer Kapillarelektrophorese mit einem Massenspektrometer via Elektrospray-Interface**

Die Anwendung des Elektrospray-Prozesses als sanfte Ionisierungstechnik eignet sich für die Kopplung von einer Kapillarelektrophorese (CE) mit einem Massenspektrometer (MS). Die geringen Flüssigkeitsmengen, die aus der CE-Kapillare über das Elektrospray-Interface ins MS gelangen, müssen zur Ausbildung der Ionen quantitativ zerstäubt werden.

Betrachtet man eine typischerweise 77 cm lange Kapillare mit 50  $\mu\text{m}$  I.D., so beträgt das Gesamtvolumen ca. 1500 nl. Wird eine Hochspannung an die Kapillare während einer CZE-ESI-MS-Messung angelegt, so entsteht in Abhängigkeit vom pH der Lösung ein schwächer oder stärker ausgeprägter EOF (siehe Abschnitt 3.1: Meßprinzipien der Kapillarelektrophorese), der sich in der Größenordnung von ca. 200 –400 nl/ min bewegt (siehe Abschnitt 4.3.5: Einfluß sheath gas).

In Abschnitt 3.3.4 soll diskutiert werden, welche Maßnahmen getroffen werden müssen, um diese kleinen Flüssigkeitsmengen ins MS zu überführen. Zuvor aber ein Vergleich zu HPLC-ESI-MS in Abschnitt 3.3.3. hinsichtlich der Applikation des Elektrospray-Prozesses

### **3.3.3 CE-ESI-MS und HPLC-ESI-MS: Ein Vergleich hinsichtlich der Applikation des Elektrospray-Prozesses**

Elektrospray kann innerhalb weniger nl/min bis zu 0.2 ml/min angewendet werden, wobei im letzten Fall eine Ausweitung von ml/min Flußraten möglich ist [Lemiere 2001]. Somit eignet sich die Elektrospray-Ionisation nicht für die Kopplung von CE, sondern auch HPLC mit einem MS. Die Probleme liegen hier in den relativ großen Flüssigkeitsströmen der HPLC [Rücker et al., 1992].

Ein Volumen von 1ml/min Wasser ergibt bei Atmosphärendruck 1244 ml/min Dampf. [Lemiere, 2001] Würde man die gesamte Flüssigkeitsmenge in das MS einbringen, so würde das dort vorliegende Hochvakuum zusammenbrechen. Praktisch wird die von der Trennsäule kommende Leitung in eine Leitung „gesplittet“, die direkt zu einem üblich dazwischengeschalteten UV-Detektor, die andere zu einem am MS angebrachtem Ventil führt, wo von dort aus die Flüssigkeit ins Elektrospray-Interface fließt. Trotz des Splittens gelangt viel Flüssigkeit ins MS, die mit Hilfe eines unterstützenden Stickstoffflusses von mehr als 0.3 l/min zerstäubt werden muß. Hier besteht ein Unterschied zu einer CE-ESI-MS-Kopplung, wobei hier geringe Flüssigkeitsmengen (siehe Abschnitt 3.3.2) ins MS gelangen. Es stellt sich also die Frage, ob hier ein sheath gas Fluß notwendig ist, um einen stabilen Spray bilden zu können.

### **3.3.4 Elektrospray-Stabilität und –Instabilität in CE-ESI-MS-Experimenten**

Bei einer CE-ESI-MS-Kopplung („sheath flow interface“) treten Probleme auf, die Ursache der verschiedenen zu ändernden Parameter sind (Kapillarposition: CE-Kapillare und ESI-needle, sheath gas Fluß und andere ESI-Bedingungen [Kirby et al., 1996]) und somit einen entscheidenden Einfluß auf die Stabilität des Elektrosprays haben. Sind die einzelnen Parameter nicht optimal aufeinander abgestimmt, treten Verluste in der Spraystabilität auf, die wiederum schlechte Signalintensitäten und Signal-Rausch-Verhältnisse hervorrufen.

Bei einer zu geringen Elektrospray-Spannung beispielsweise kann die aus der CE-Kapillare austretenden Flüssigkeit nicht mehr zerstäubt werden. Durch Abreißen des Flüssigkeitstropfens kann kurzzeitig eine Überspannung zwischen der ESI-Nadel und der Gegenelektrode aufgebaut werden, die sich entlädt und wieder aufbaut, wenn ein erneuter Tropfen abreißt.

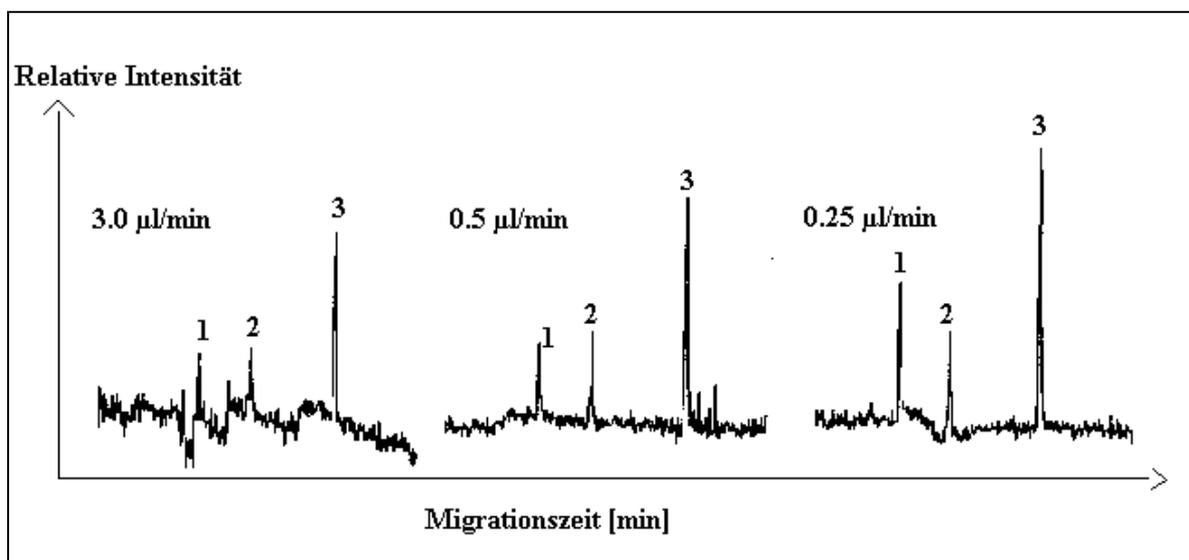
Ein zu hoher sheath gas Fluß bewirkt ein zu schnelles Abreißen des Tropfens von der CE-Kapillare. Das resultiert in einem hochfrequenten sinusähnlichen Hintergrundsignal, das im MS anhand der „Total Ion current (TIC)“- Spur erkannt werden kann. Eine sogenannte „Retroelution“ kann auch bei einem zu hohen sheath gas Fluß beobachtet werden, dadurch

wird ein Überdruck induziert, was eine Erhöhung der Migrationszeiten der Analyten zu Folge hat [Martin-Girardeau und Renoud-Gonnord, 2000].

Ist die Distanz zwischen ESI-Nadel und Gegenelektrode (heated capillary) zu hoch, reicht die angelegte ESI-Spannung nicht mehr aus, die Flüssigkeit optimal zu zerstäuben, ebenso wird im entgegengesetzten Fall eine zu kleine Distanz und eine zu hohe ESI-Spannung kein optimales Signal erreicht. Der Weg für den Ionenbildungsprozess ist hier zu gering.

Ein zu geringer sheath liquid Fluß führt zu einem Verlust der notwendigen Flüssigkeitsmenge im Elektrospray, was in einem „unregelmäßig spritzenden Effekt“ resultiert [Martin-Girardeau, 2000]. Eine zu hohe sheath liquid Flußrate hat allerdings einen stark verdünnenden Einfluß, so daß die Signalintensität reduziert werden kann.

Kirby [Kirby et al., 1996] untersuchte Trennungen von Peptiden mit drei verschiedenen Sheath liquid Flußraten (3.0, 0.5 und 0.25  $\mu\text{l}/\text{min}$ ), wobei eine signifikante Verbesserung des Signal-Rauschverhältnisses mit Abnahme der Flußrate beobachtet werden konnte (Abb. 9).



**Abb. 9:** Zusammenhang sheath liquid Menge und Intensität des Substanzsignals [nach Kirby et al., 1996, verändert]

## **4. Experimentelle Ergebnisse und deren Diskussion**

### **4.1 Entwicklung von CE-Methoden zur quantitativen Analytik von ausgewählten Agrochemikalien (zunächst ohne MS)**

Die Zielsetzung der vorgestellten CE-, „UV“-Methoden war die Entwicklung CE-ESI-MS kompatibler Methoden zur Analytik von ausgewählten Agrochemikalien, zunächst aber ohne Kopplung mit einem Massenspektrometer (vgl. Kapitel 1, S. 3, Punkt 1a).

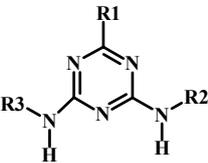
Die Partial filling mizellar elektrokinetische Chromatographie (PF-MEKC) und nichtwässrige CE (NACE) wurden als CE-ESI-MS kompatible Methoden eingesetzt. Deshalb wurden Trennparameter untersucht, die die Trenneffizienz (Reproduzierbarkeit, Methodenlinearität) beeinflussten. Die Ergebnisse wurden mit denen der klassischen MEKC verglichen.

Die getesteten CE-Bedingungen beinhalteten Puffermolarität, pH, Konzentration des organischen Lösungsmittels und des Tensids, angelegte Hochspannung, Injektionszeit der Probe und Länge der Partial filling-Zone. Die Nachweisgrenzen mit  $S/N = 3$  wurden bestimmt. Die Mobilitätstransformation ( $\mu$ -Skala) verbesserte den qualitativen Vergleich der Elektropherogramme und die Reproduzierbarkeit quantitativer Daten (integrierte Peakfläche), so daß diese Transformation, bekannt aus der CZE, auf andere EOF-abhängige CE-Techniken wie PF-MEKC und NACE übertragen werden konnte [Menzinger et al., 2001].

#### **4.1.1 Partial – filling (PF) – MEKC (UV) – Methode**

##### **4.1.1.1 Struktur der analysierten Substanzen**

In folgender Tabelle 4 sind all die Substanzen (s-Triazin-Herbizide) aufgelistet, die im Rahmen des Partial filling MEKC (UV) untersucht worden sind:

Analyt	Strukturformel (Grundstruktur)	Name	R1	R2	R3
s-Triazin		Atrazin	Cl	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
		Simazin	Cl	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
		Propazin	Cl	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
		Terbuthylazin	Cl	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
		Sebuthylazin	Cl	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
		Desethylatrazin	Cl	H	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
		Desisopropylatrazin	Cl	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
		Hydroxyatrazin	OH	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
		Hydroxysimazin	OH	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
		Hydroxypropazin	OH	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
		Hydroxyterbuthylazin	OH	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
		Hydroxydesethylatrazin	OH	H	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
		Terbutryn	SCH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
		Prometryn	SCH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
		Ametryn	SCH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
		Atraton	OCH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

Tab. 4: In PF-MEKC (UV) untersuchte s-Triazine

#### 4.1.1.2 Parameter, die eine Trennung in PF-MEKC (UV) beeinflussen

Im Vergleich zur klassischen mizellaren elektrokinetischen Chromatographie (MEKC), wird in der Partial-filling – Technik (PF-MEKC) nur ein Teil der Kapillare mit Mizellarpuffer, befüllt (vgl. auch Abschnitt 4.3.1 f), nachdem die Kapillare mit Hintergrundelektrolyt (ohne Mizellen) gespült wurde.

Die Partial filling Technik wurde schon erfolgreich für die Analytik von ausgewählten s – Triazin - Herbiziden [Nelson et al., 1996] und zueinander ähnlichen Peptiden [Koezuka et al., 1997] angewandt. Die Trennung von Enantiomeren via Affinitäts – elektrokinetischer – Chromatographie mit Proteinen als pseudostationären Phasen wurde auch in Partial filling durchgeführt [Tanaka, Terabe, 1995].

Die Trennung erfolgte in der mizellaren Zone und der Hintergrundpuffer eluierte aus der Kapillare; die Mizellarzone verblieb innerhalb der Kapillare und unter optimalen Bedingungen erreichte die pseudostationäre Phase nicht das Ende der Kapillare – das war besonders für eine Kopplung mit einem Massenspektrometer wichtig.

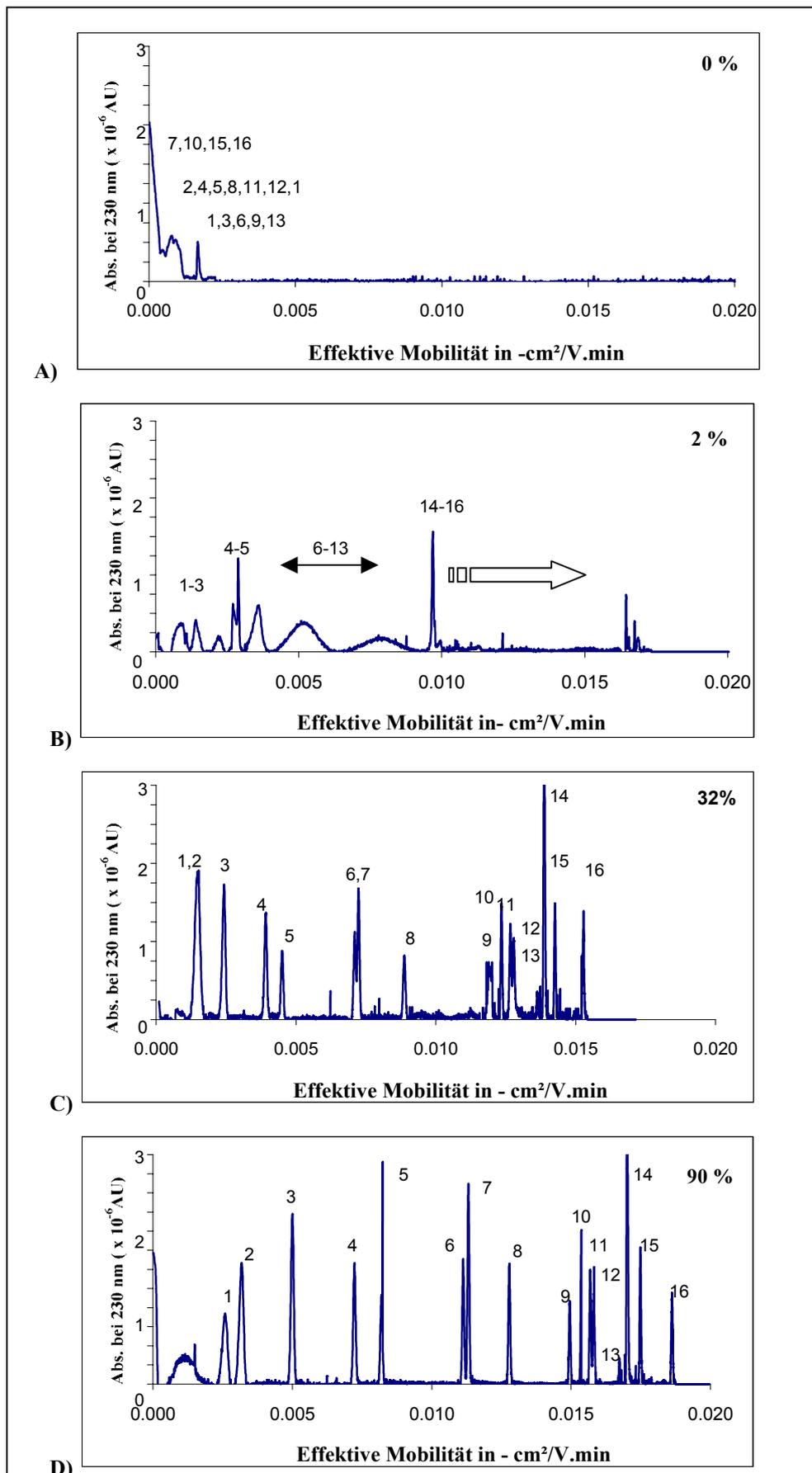
Der Füllungsgrad der Kapillare mit Mizellarpuffer spielte eine wichtige Rolle für Trennungen in PF-MEKC. Die Zunahme des Füllungsgrades der Kapillare (% des Gesamtvolumens) hatte einen positiven Effekt auf die Trennung von Substanzen verbunden

mit einer Zunahme der effektiven Mobilität (Hydroxydesethylatrazin, Desisopropylatrazin, Desethylatrazin, Simazin und Hydroxysimazin).

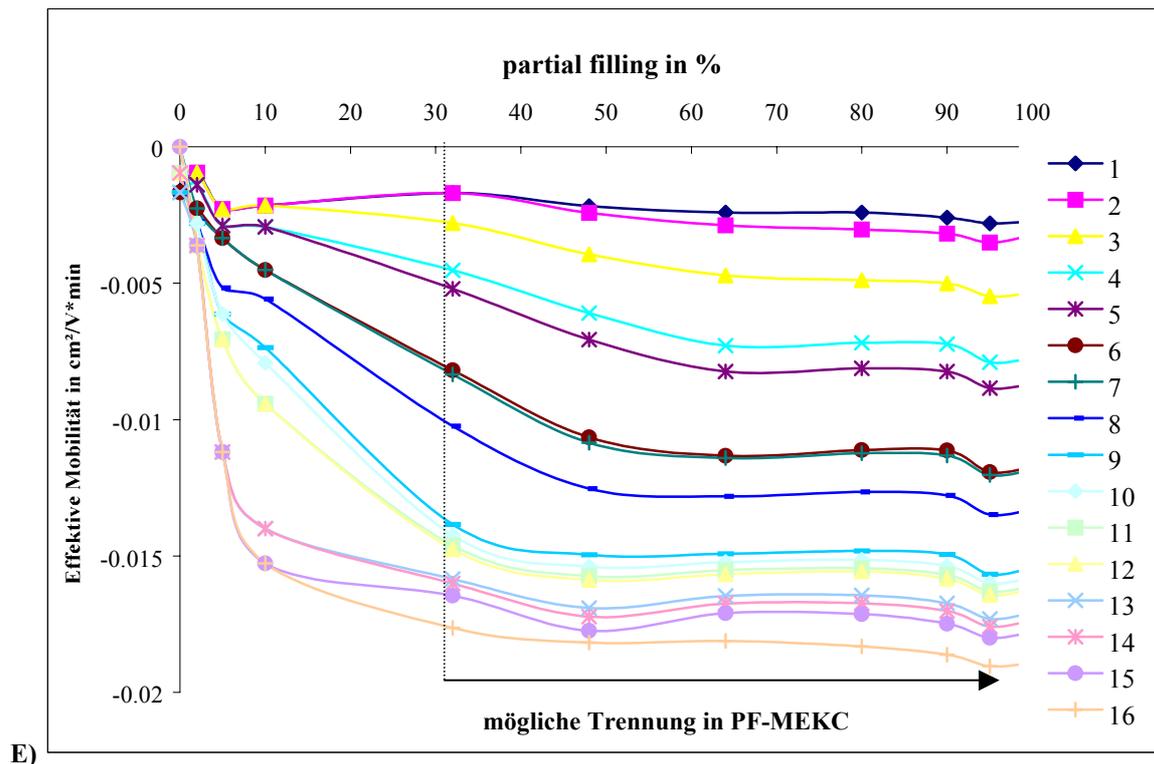
Von 2 – 30 % Partial filling eluierten die Substanzen vor der Mizellarfront (Abb. 10 a-e); die Basislinie war unruhig, was Ursache einer zu kurzen Mizellarzone war. Alle Elektropherogramme wurden in effektive Mobilitätsskala transformiert, um eine direkte Visualisierung der Ergebnisse zu ermöglichen (vgl. auch Abschnitt 3.1.1). Diese Methode normalisierte die Rohdaten abhängig von EOF, Kapillarlänge und angelegter Hochspannung [Schmitt-Kopplin et al., 1999 a, 2001].

Optimale Bedingungen für die Trennung der 16 s-Triazine wurden von ca. 30 bis 90 % Kapillarenfüllung erhalten. Unter diesen Bedingungen wurden alle Analyten innerhalb 30 Minuten getrennt. Diejenigen Substanzen, die näher zum EOF migrierten, hatten geringere Log  $K_{ow}$ -Werte und Kapazitätsfaktoren (vgl. auch Abschnitt 3.1.2) als hydrophobere Analyten, die näher zur Mizellarfront wanderten. Diese hydrophoberen Komponenten wären schwieriger zu analysieren, wenn eine Kopplung mit einem Massenspektrometer vorgenommen würde (vgl. Abschnitt 4.3.1).

Der pH wurde für eine optimale Trennung zwischen pH 6 und 11.5 getestet. Hierbei kristallisierte bei einem pH-Wert kleiner 8 heraus, daß die Hydroxytriazine eine höhere Affinität zur mizellaren Phase hatten - als eine Konsequenz ionischer Bindungen -, da der isoelektrische Punkt der meisten hier untersuchten Hydroxytriazine bei  $pI = 7.5$  lag [Schmitt-Kopplin et al., 1999 b]. Bei diesem pH waren tautomere Formen der Hydroxytriazine sowohl negativ als auch positiv geladen [Schmitt-Kopplin et al., 1997]. Unter diesen neutralen pH Bedingungen konnte hauptsächlich die Mizellarfront erkannt und die Substanzen nicht gut getrennt werden. Die besten Bedingungen wurde zwischen pH 9.0 und 9.4 gefunden. Bei einem pH-Wert größer 9.4 (bis zu 11.5) coeluierten Peaks mit unzureichender Trenneffizienz, so daß bei Verwendung eines Boratbuffers (pH 9.2) die besten Trennbedingungen der 16 s-Triazine erhalten wurden. (ohne Abbildung).



**Abb. 10:** Einfluß des Füllungsgrades (Partial filling) der Kapillare mit Mizellarpuffer auf die Trenneffizienz (pH 9.2), genaue Beschreibung: nächste Seite



**Abb. 10:** Einfluß des Füllungsgrades (Partial filling) der Kapillare mit Mizellarpuffer auf die Trenneffizienz (pH 9.2); BGE: 80 mmol/l Natriumborat, 14 % Methanol; Puffer: 80 mmol/l Natriumborat, 70 mmol SDS, 14 % Methanol : (a) 0 % keine Mizellen, (b) 2 % Partial filling, (c) 32 % , (d) 90 % (e) Darstellung der effektiven Mobilität der analysierten Substanzen (cm<sup>2</sup>/V.min) in Abhängigkeit vom Füllungsgrad der Kapillare mit Mizellarpuffer. Zuordnung der Peaks: 1 = Hydroxydesethylatrazin, (2) = Desisopropylatrazin, (3) = Desethylatrazin, (4) = Hydroxysimazin, (5) = Simazin, (6) = Hydroxyatrazin, (7) = Atraton, (8) = Atrazin, (9) = Hydroxypropazin, (10) = Ametryn, (11) = Propazin, (12) = Sebuthylazin, (13) = Hydroxyterbutylazin, (14) = Terbutylazin, (15) = Prometryn, (16) = Terbutryn [Menzinger et al., 2001].

Die Boratpufferkonzentration wurde zwischen 20 und 70 mmol/l für die klassische MEKC (ohne Anwendung der PF-Technik) und zwischen 20 und 100 mmol/l im Falle der PF-MEKC (UV) untersucht. Optimale Konzentrationen erhielten wir für 80 mmol/l (PF-MEKC) und 40 mmol (klassische MEKC). Mit zunehmender Puffermolarität nahm die Migrationszeit des EOF zu und konsequenterweise auch die Analysenzeit (28-33 min). Die Konzentrationen in PF-MEKC mußten gegenüber der klassischen MEKC erhöht sein, um „dieselbe“ Trenneffizienz gewährleisten zu können.

Zusätzlich wurden verschiedene SDS-Konzentrationen und Methanol als „Organic modifier“ untersucht. 70 mmol/l SDS, 14 % Methanol (v/v) im Falle des PF-MEKC (UV) und 60 mmol/l SDS, 12 % Methanol (v/v) waren die besten Bedingungen. Als der Methanolgehalt

erhöht wurde, resultierte das in einer besseren Selektivität und Basislinietrennung (Peaks 1, 2 und 6,7 in Abb.11 c,d).

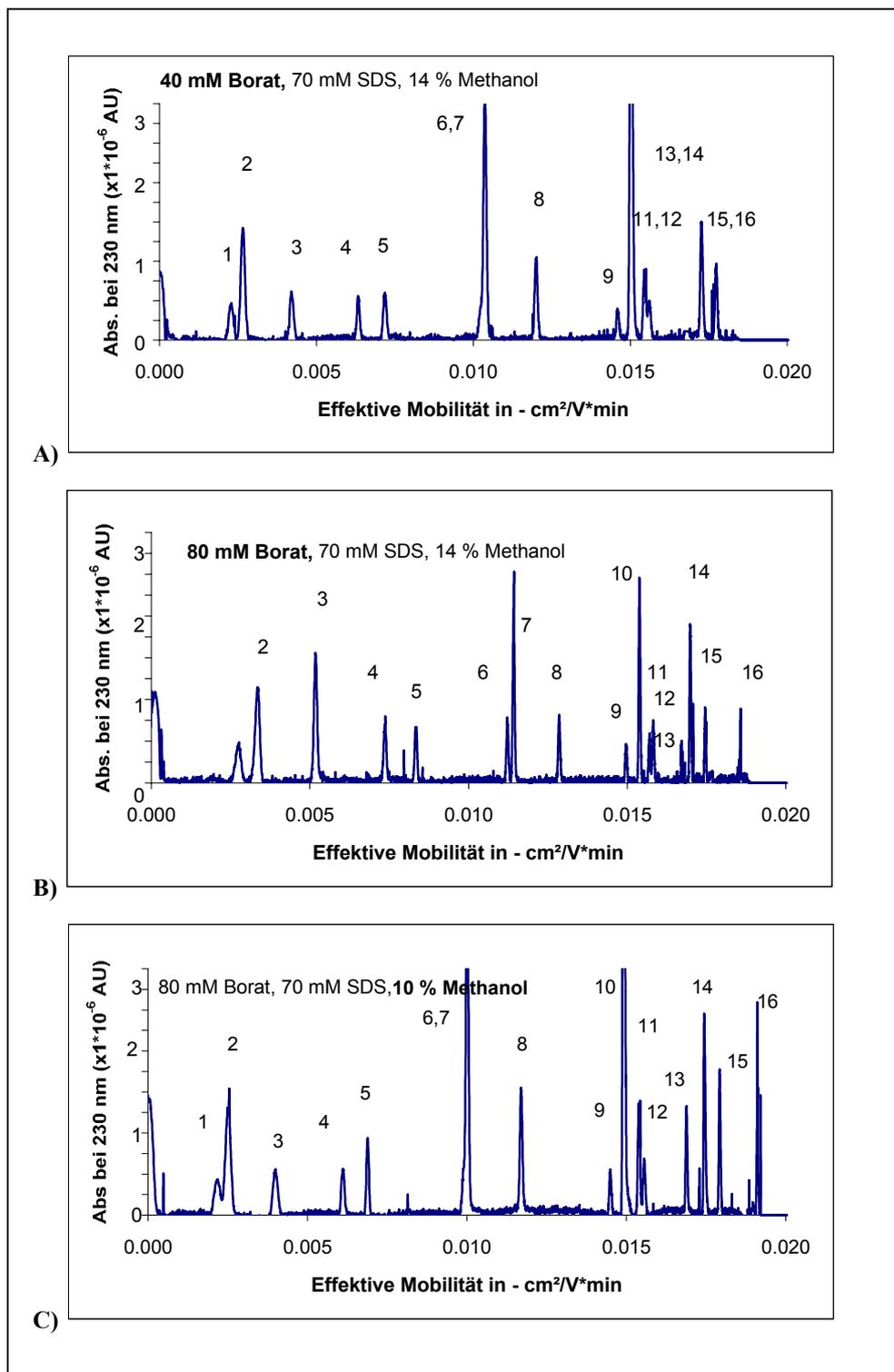
Größere Konzentrationen als 100 mmol/l ergaben einen Bandenverbreiterungseffekt (Abb. 11 e,f). Das war Ursache der Zone zwischen der wässrigen (Hintergrundpuffer = HG) und der Mizellarzone (Trennpuffer = TP), die die Analytmoleküle aufgrund einer höheren Ionenstärke ( $I(\text{TP}) > I(\text{HG})$ ) und einer geringeren elektroosmotischen Geschwindigkeit ( $\mu_{\text{eo}}(\text{TP}) < \mu_{\text{eo}}(\text{HG})$ ) passierten [Michalke et al., 2001].

Die CE-Hochspannung wurde in einem Bereich zwischen 22 und 30 kV getestet und 26 (24) kV waren für PF-MEKC (UV) bzw. klassischer MEKC optimal. Höhere Spannungen verursachten Basislinienprobleme und Schwankungen im Strom („current“).

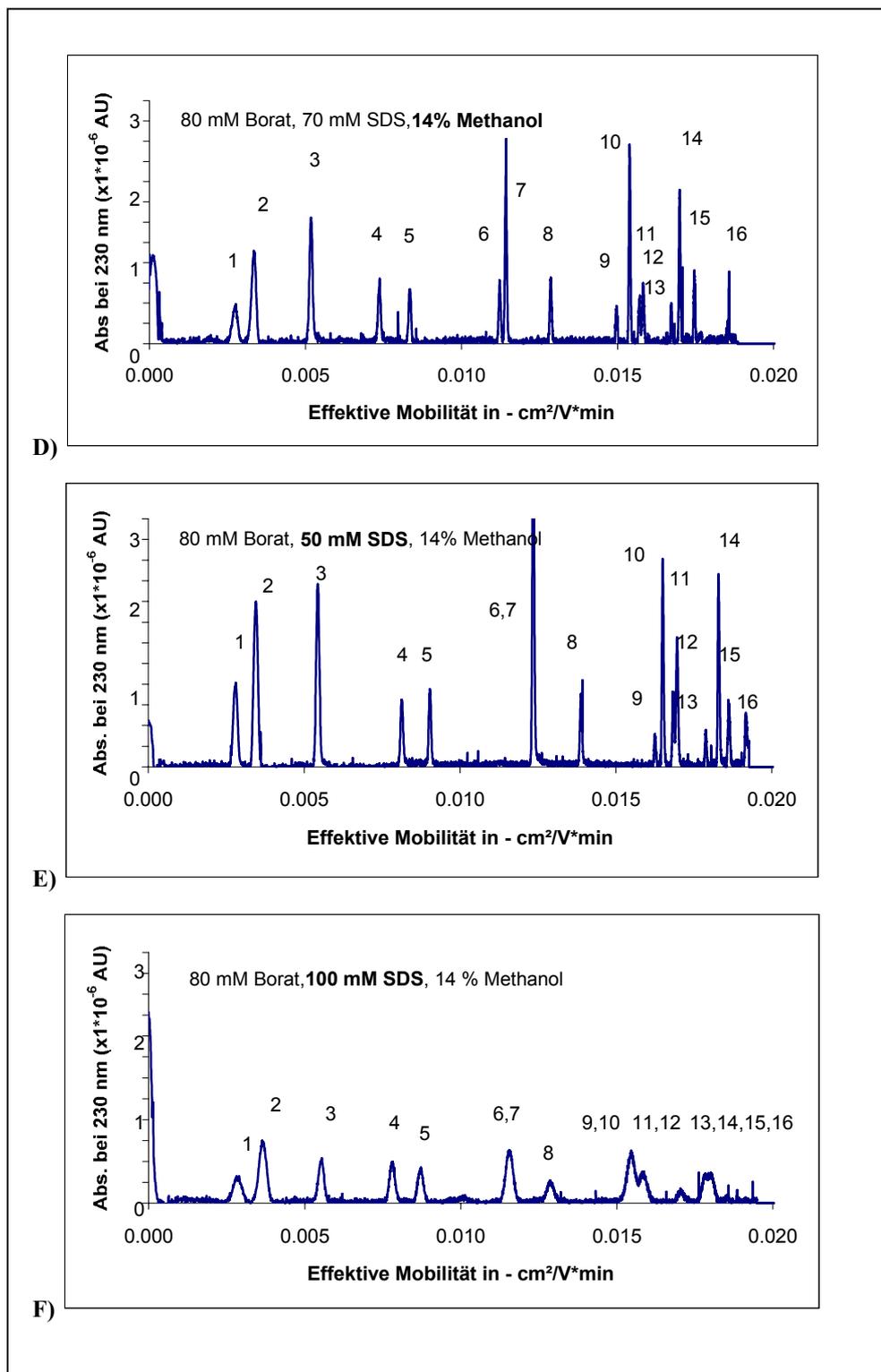
#### 4.1.1.2 Quantifizierung

Die Nachweisgrenzen (LOD) wurden für ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3 ermittelt und lagen für die analysierten s-Triazine zwischen 0.12 und 0.29 mg/l (Tab. 5). Der Regressionskoeffizient  $R^2$  (n=7) war ein Maß für die Linearität der Standardkurven (Konzentrationen zwischen 0.5 mg/l und 10 mg/l).

Die relativen Standardabweichungen (RSD %) der Migrationszeit, Mobilität  $\mu$ , Fläche (Zeit- und  $\mu$ -Skala), Fläche in Bezug auf internen Standard (Simazin), zeitkorrigierte Fläche (Zeit- ( $A_t/t$ ), und  $\mu$ -Skala ( $A_{\mu,t}$ ) für neun Wiederholungsmessungen werden in Tabelle 5 dargestellt. Die Migrationszeiten waren reproduzierbar, mit einem RSD% zwischen 0.8 und 1.2 % (RSD% nahm mit höheren Migrationszeiten zu); die effektive Mobilität (unabhängig von der Migrationszeit) lag bei ähnlichen Werten (0.8 bis 1.1%).



**Abb. 11:** Elektropherogramme (16 s-Triazine) unter verschiedenen Trennbedingungen in PF-MEKC (UV); Genaue Beschreibung: nächste Seite



**Abb. 11:** Elektropherogramme (16 s-Triazine) unter verschiedenen Trennbedingungen in PF-MEKC (UV): (a) = 40 mmol/l Natriumboratpuffer, pH 9.2, 70 mmol/l SDS, 14 % Methanol (v/v); (b) = 80 mmol/l Natriumboratpuffer, pH 9.2, 70 mmol/l SDS, 14 % Methanol (v/v); (c) 10 % Methanol (v/v) zu Laufpuffer gemischt (80 mmol/l Natriumborat, pH 9.2, 70 mmol/l SDS); (d) = 14 % Methanol (v/v) zu Laufpuffer gemischt (vgl. unter c); (e) = 50 mmol/l SDS, 80 mmol/l Natriumborat, pH 9.2, 14 % Methanol; (f) = 100 mmol/l SDS, 80 mmol/l Natriumborat, pH 9.2, 14 % Methanol (v/v). Peakzurordnungen: vgl. Abbildung 10 [Menzinger et al., 2001].

---

Die Peakintegration in Zeitskala ( $A_t$ ) variierte zwischen 1.4 bis 5.2 %. Die gemessene Fläche ( $A_\mu$ ) nach Transformation in effektive Mobilitätsskala ( $\mu$ -Skala) zeigte keine systematische Zunahme der Reproduzierbarkeit (2.3 bis 5.3 %). Da die Reproduzierbarkeit in Zeitskala schon gut war (ca. 1 %) , verbesserte sich die zeitkorrigierte Peakfläche ( $A_t/t$ ) nicht. Nach Transformation in  $\mu$ -Skala mit Simazin als internen Standard waren RSD%-Werte der integrierten Peakflächen besser (1.1-3.0%). Wie oben beschrieben, ergaben sich bei der Zeitkorrektur der Fläche der  $\mu$ -Skala (mit Simazin als internen Standard) keine besseren Werte. Die Tatsache, daß eine Mobilitätstransformation mit einem internen Standard immer die Reproduzierbarkeit der Peakflächen erhöht, wurde schon in der CZE gezeigt [Schmitt-Kopplin et al., 2001]; zudem nahm die Verbesserung der Reproduzierbarkeit in  $\mu$ -Skala mit zunehmender reproduzierbarer Migrationszeit ab. Insgesamt gesehen, konnte die  $\mu$ -Skala-Transformation mit einem internen Standard vor einer Quantifizierung in PF-MEKC (UV) verwendet werden.

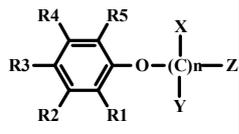
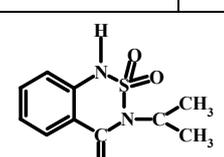
Analyt	LOD [mg/L] S/N=3	R <sup>2</sup> [n=7]	RSD %	RSD %	RSD %	RSD %	RSD %	RSD %	RSD %	RSD %
			Migrations- zeit [n=9]	Mobilität ( $\mu$ ) [n=9]	Fläche (von Zeitskala) [n=9]	Zeitkorrigierte Fläche (von Zeitskala) A <sub>t</sub> /t [n=9]	Fläche (von $\mu$ -Skala) [n=9]	Zeitkorrigierte Fläche (von $\mu$ - Skala) A $\mu^*t$ [n=9]	Fläche ( $\mu$ - Skala, von int. Std.) [n=9]	Zeitkorrigierte Fläche, $\mu$ -Skala, von int. Std.) A $\mu^*t$ [n=9]
Hydroxydesethylatrazin	0.29	0.9921	0.81	1.8	3.2	3.7	4.6	4.0	1.3	1.9
Desisopropylatrazin	0.15	0.9935	0.71	1.0	1.5	1.5	2.3	2.6	1.1	1.5
Desethylatrazin	0.18	0.9794	0.73	0.8	3	3	2.8	3.0	1.7	1.9
Hydroxysimazin	0.24	0.9171	0.71	1.1	2.1	2.2	3.6	3.2	2.1	2.0
Simazin	0.17	0.9746	0.79	0.80	3.5	3.9	2.5	2.3	1.6	2.1
Hydroxyatrazin	0.28	0.9606	0.79	1.0	5.2	5.9	4.7	3.9	2.0	2.1
Atraton	0.12	0.9241	0.84	0.80	4	4.5	3.4	3.6	1.6	2.3
Atrazin	0.2	0.9294	0.89	0.81	3.3	3.3	2.6	3.1	2.1	2.8
Hydroxypropazin	0.22	0.9788	0.96	0.99	1.4	1.7	3.6	3.0	2.2	2.5
Ametryn	0.18	0.9916	1.0	0.83	4.6	5.2	5.3	4.9	1.4	1.9
Propazin	0.12	0.9934	1.0	0.86	5.2	5.2	4.7	4.7	2.5	3.0
Sebuthylazin	0.14	0.9978	1.1	0.92	3.5	3.2	2.3	3.7	1.7	2.1
Hydroxyterbuthylazin	0.21	0.9756	1.2	0.96	2.8	2.8	3.2	2.9	3.0	3.6
Terbuthylazin	0.16	0.9872	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Prometryn	0.12	0.9073	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Terbutryn	0.13	0.9906	1.1	0.88	5.0	5.6	3.6	5.3	6.2	5.6

**Tab. 5:** Nachweisgrenzen (LOD, mg/l) bei S/N = 3, R<sup>2</sup> und RSD% von Migrationszeit, Mobilität  $\mu$ , zeitkorrigierter Fläche (von Zeitskala A<sub>t</sub>/t), zeitkorrigierter Fläche (von  $\mu$ -Skala A $\mu^*t$ ), Fläche (von  $\mu$ -Skala; A $\mu$ ), Fläche von internen Standard (Simazin: von  $\mu$ -Skala; A $\mu$ ), und zeitkorrigierter Fläche von internen Standard (Simazin; von  $\mu$ -Skala; A $\mu^*t$ ), für PF-MEKC (UV)- Analyse; n.a. = nicht analysiert [Menzinger et al., 2001].

## 4.1.2 NACE-Methode (UV)

### 4.1.2.1 Struktur der analysierten Substanzen

In folgender Tabelle 6 sind all die Substanzen aufgelistet, die im Rahmen des NACE untersucht worden sind:

Analyt	Strukturformel	Name	n	X	Y	Z	R1	R2	R3	R4	R5
Phenoxysäuren		2,4-D	1	H	H	COOH	Cl	H	Cl	H	H
		MCPA	1	H	H	COOH	CH <sub>3</sub>	H	Cl	H	H
		Mecoprop	1	CH <sub>3</sub>	H	COOH	CH <sub>3</sub>	H	Cl	H	H
		Dichlorprop	1	CH <sub>3</sub>	H	COOH	Cl	H	Cl	H	H
Benzothiadiazin		Bentazon									

**Tab. 6:** Untersuchte Substanzen in NACE ; neben diesen in dieser Tabelle aufgelistet Substanzen spielten s-Triazine eine Rolle, deren Struktur in Tab. 5 gezeigt wurde.

### 4.1.2.2 Parameter, die eine Trennung in NACE( UV) beeinflussen

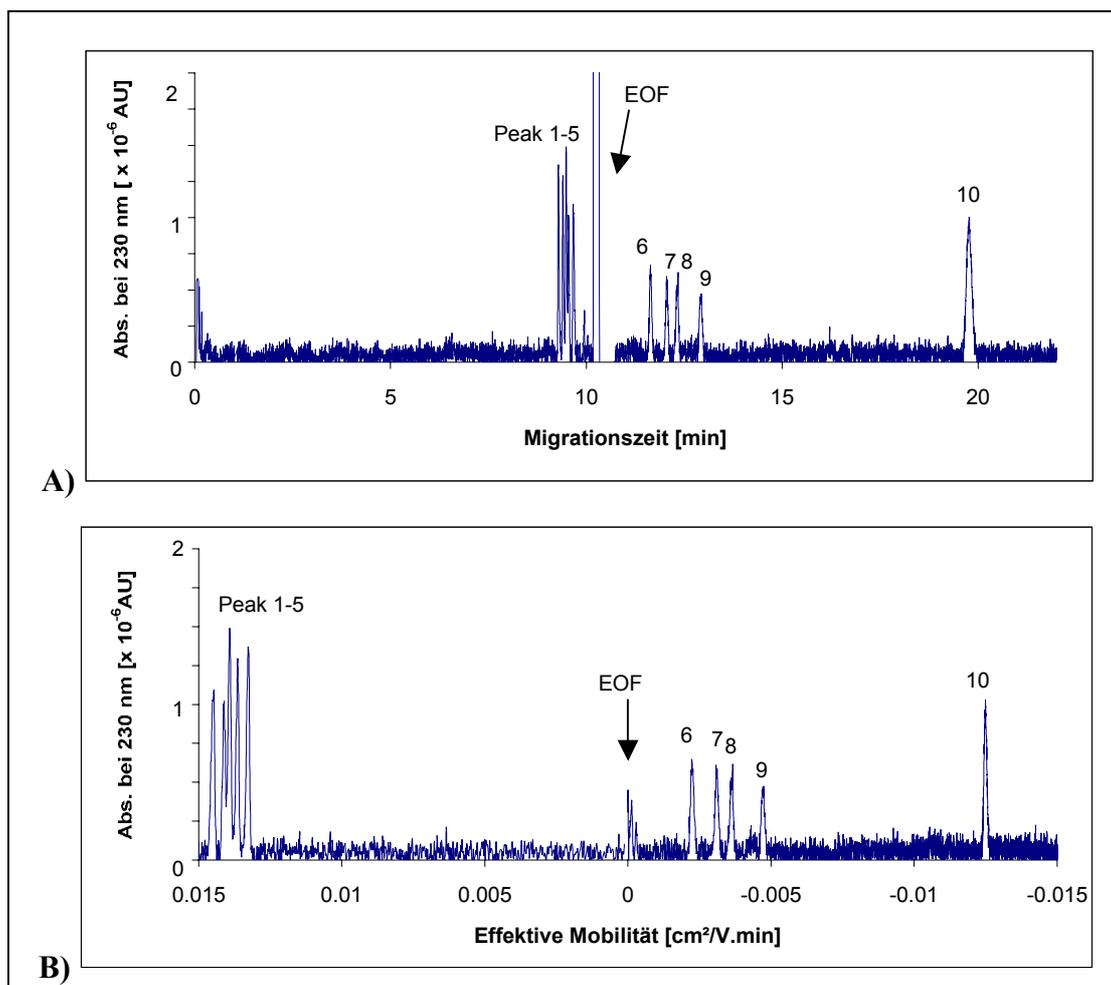
Die getesteten Bedingungen umfaßten den pH\* („apparent pH“), die Molarität des Puffers B<sup>1</sup>, die angelegte Hochspannung (kV) und die Injektionszeit.

Zwischen pH\* 3.9 und 5.0 wurde die Analyse von s-Triazinen als Kationen und die anderen Pestizide (Phenoxysäuren, Bentazon) als Anionen getestet. Die beste Trenneffizienz erhielten wir für pH\* 4.7 (Abb. 12). Nur Hydroxyatrazin (Peak 3) und Hydroxydesethylatrazin (Peak 4) konnten bis zur Basislinie nicht getrennt werden. Der pH\* des NACE-Puffers wurde durch Zugabe von Essigsäure (100%) zur Stammlösung (A+B-Puffer<sup>2</sup>) reduziert.

Bei pH\* 4.7 hing die Viskosität des Puffers hauptsächlich von der Zusammensetzung des Methanol-Acetonitril-Gemisches ab; die Viskositäten von Acetonitril und Methanol lagen bei 20 °C bei 0.37 bzw. 0.6 mPas.

<sup>1</sup>) B-Puffer Ammoniumacetat + Acetonitril-Methanol-Essigsäure-Mix; <sup>2</sup>) A+B-Puffer: B-Puffer + Essigsäure + Acetonitril-Methanol-Essigsäure-Mix = Hintergrundelektrolyt; abgeleitet von Herstellung wässriger Puffer, wie z.B. Ammoniumacetat).

Bei Reduzierung des pH\* der kompletten Pufferlösung hing die Viskosität mehr und mehr von der zugegebenen Essigsäure ab (Viskosität bei 20 °C 1.24 mPas). Die Viskosität erhöhte sich und der Effekt des zunehmenden pH\* ließ sich der erhöhten Viskosität zuschreiben. Bei pH\* 5.0 konnten Hydroxydesethylatrazin (Peak 4) und Hydroxypropazin (Peak 5) nicht getrennt werden (ein Peak; Daten nicht gezeigt).



**Abb. 12:** Elektropherogramme für kationische und anionische Pestizide in NACE ; (A) = Zeitskala, (B) =  $\mu$ -Skala (rekonstruiertes Elektropherogramm), (1) = Hydroxysimazin, (2) = Hydroxyterbuthylazin, (3) = Hydroxyatrazin, (4) = Hydroxydesethylatrazin, (5) = Hydroxypropazin, (6) = Dichlorprop, (7) = Mecoprop, (8) = 2,4-D, (9) = 4-Chlor-o-tolyloxyessigsäure (MCPA), 10 = Bentazon [Menzinger et al., 2001].

Die Molarität der Pufferlösung B wurde zwischen 25 und 100 mmol/l Ammoniumacetat in Acetonitril-Methanol-100 % Essigsäure untersucht. Wie in den Messungen der verschiedenen Boratkonzentration (MEKC) zeigten höhere Werte einen Shift zu höheren Migrationszeiten.

Die beste Konzentration des Puffers B war 50 mmol/l. Die Zusammensetzung des Hintergrundelektrolyten wurde konstant bei 74:25:1 (Acetonitril-Methanol-Essigsäure) belassen.

Die für die Messungen geeignetste CE-Spannung war 24 kV, nachdem zwischen 18 und 30 kV getestet wurde.

#### **4.1.2.3 Quantifizierung**

Die Nachweisgrenzen (LOD,  $S/N = 3$ ) lagen zwischen 0.16 und 0.26 mg/l für eine 5 sec. Injektion. Der Regressionskoeffizient  $R^2$  ( $n=7$ ) als Maß für die Linearität der Eichkurve wurde innerhalb 0.5 und 10 mg/l bestimmt.

Die relative Standardabweichungen (RSD%) von Migrationszeit, Mobilität, und zeitkorrigierter Fläche in Zeitskala und Mobilitätsskala werden in Tab. 7 dargestellt.

Die Mobilitätstransformation wurde mit Hydroxyatrazin und Dichlorprop als interne Standards für Kationen bzw. Anionen durchgeführt. RSD% aller gemessenen Flächen (Zeitskala) der Elektropherogramme beliefen sich auf 4.7 bis 15 %. Was auffiel war, daß keine Verbesserung nach Zeitkorrektur auftrat. Für die Anionen bewegte sich RSD% (Fläche in Mobilitätsskala) zwischen 1 und 1.3 %. Die Mobilitätsskala war demzufolge geeignet für quantitative Messungen in NACE. Für die Kationen war der interne Standard von Nutzen, um in Mobilitätsskala gute Werte für die Standardabweichungen zu bekommen ( $< 2\%$ ). Die Zeitkorrektur der Fläche von der Mobilitätsskala zeigte keine Verbesserung der Reproduzierbarkeit und konnte deshalb hierfür nicht verwendet werden.

Analyt	LOD	R <sup>2</sup>	RSD %	RSD %	RSD %	RSD %	RSD %	RSD %	RSD %	RSD %
	[mg/L] S/N=3	[n=7]	Migrations- zeit [n=6]	Mobilität [n=6]	Fläche (von Zeitskala) [n=6]	Zeitkorrigierte Fläche (von Zeitskala) [n=6]	Fläche (von $\mu$ -Skala) [n=6]	Zeitkorrigierte Fläche (von $\mu$ - Skala) $A_{\mu}^*t$ [n=6]	Fläche ( $\mu$ - Skala, von int. Std.) (OH-Atrazin) [n=6]	Zeitkorrigierte Fläche, ( $\mu$ - Skala, von int. Std.) $A_{\mu}^*t$ [n=6]
Hydroxysimazin	0.19	0.9683	3.5	3.4	7.1	4.1	7.7	8.8	1.6	4.7
Hydroxyterbuthylazin	0.19	0.9705	3.5	3.4	7.9	4.5	7.0	11.5	1.4	3.2
Hydroxyatrazin	0.16	0.9702	3.5	3.4	4.7	4.3	7.2	12.1	1.3	4.1
Hydroxydesethylatrazin	0.19	0.9604	3.5	3.5	9.7	2.6	7.9	7.7	1.4	4.0
Hydroxypropazin	0.19	0.9653	3.6	3.5	11.5	3.8	9.7	10.4	1.8	3.5
									<b>(Dichlorprop)</b>	
Dichlorprop	0.23	0.9556	3.9	1.6	7.8	6.3	1.1	5.5	2.8	2.7
Mecoprop	0.23	0.9481	4.1	1.8	7.6	3.5	1.1	4.2	2.8	2.8
2,4-D	0.26	0.9648	4.2	1.6	12.6	11.2	1.3	4.3	3.5	3.8
MCPA	0.25	0.9330	4.4	2.0	15.0	10.7	1.0	5.2	2.2	6.9
Bentazon	0.20	0.933	4.3	1.4	11.4	6.8	1.0	5.5	2.3	5.4

**Tab. 7:** Nachweisgrenzen (LOD,mg/l) bei S/N = 3, R<sup>2</sup> und relative Standardabweichung (RSD%) von Migrationszeit, Mobilität ( $\mu$ ), zeitkorrigierter Fläche (von Zeitskala;  $A_t/t$ ), zeitkorrigierter Fläche ( von  $\mu$ -Skala;  $A_{\mu}/t$ ), Fläche (von  $\mu$ -Skala;  $A_m$ ), Fläche von internen Standard (für Kationen: OH-Atrazin, für Anionen: Dichlorprop; von  $\mu$ -Skala;  $A_{\mu}$ ) und zeitkorrigierter Fläche von internen Standard ( von  $\mu$ -Skala  $A_{\mu}t$ ) für NACE-Messungen (Kationen und Anionen) [Menzinger et al, 2001].

### 4.1.3 Vergleich der beiden Methoden und Schlußfolgerungen

Die maximal mögliche Injektionszeit wurde in der PF-MEKC-Technik mit 30 bis 70 sec. abhängig von den einzelnen Analyten und in NACE mit 8 bis 10 sec. für fünf ausgewählte Hydroxytriazine ermittelt.

Da die Viskosität des NACE-Puffers geringer war als die des PF-MEKC-Puffers, konnte für dieselbe Zeiteinheit in NACE mehr Analyt oder Puffer injiziert werden (Tab. 8). Daraus ergab sich, daß in NACE schon nach 8-10 sec der Linearitätsbereich verlassen wurde. Die Nachweisgrenzen waren (relativ gesehen) höher als in der PF-MEKC-Technik. Die absolute Nachweisgrenze variierte mit maximal möglichen Injektionszeit zwischen 0.1 und 0.12 mg/l in NACE.

Wenn alle Analyten zusammen in Lösung vorgelegt werden, sollte die geringste Injektionszeit, d.h. 30 sec. in PF-MEKC und 8 sec. in NACE den Messungen zugrunde gelegt werden.

Bei einer Kopplung mit einem Massenspektrometer müssen weitere Parameter berücksichtigt werden (vgl. auch 3.3.4 und 4.3 ff), so daß die Durchführung der CE-ESI-MS-Messungen „delikater“ ist. Im Falle des Partial filling müßte zusätzlich eine Kontamination der Ionenquelle durch niedermolekulare Tenside wie SDS vermieden werden, da es sonst zu einer Reduzierung in der Signalintensität kommen könnte. NACE würde sich prinzipiell besser für eine Kopplung mit einem Massenspektrometer eignen, da alle Reagenzien leicht flüchtig sind.

Analyt	Maximale lineare Injektionszeit [sec]		Injektionsvolumina [nl]		Injizierte Menge [ng]		Absoluter LOD [mg/L]	
	PF-MEKC	NACE	PF-MEKC	NACE	PF-MEKC	NACE	PF-MEKC	NACE
OH-Simazin	70	8	270	125 <sup>(a)</sup>	0.14	0.06	0.027	0.12
OH-Terbuthylazin	40	10	155	160 <sup>(a)</sup>	0.08	0.08	0.042	0.10
OH-Atrazin	30	8	115	125 <sup>(a)</sup>	0.06	0.08	0.075	0.10
OH-DEA	50	8	190	160 <sup>(a)</sup>	0.1	0.08	0.046	0.12
Oh-Propazin	60	10	230	125 <sup>(a)</sup>	0.11	0.06	0.029	0.10

**Tab. 8:** Vergleich der Nachweisgrenzen (LOD, mg/l) und maximale Injektionszeit (mit einer 87 cm Kapillare bestimmt, Gesamtvolumen: 3844 nl) in PF-MEKC (zwischen 5 und 80 sec.) und in NACE (zwischen 2 und 20 sec.); die Viskosität der Lösungen betrug 20 °C in PF-MEKC mit einem Wert von 1angenommen, in NACE ca. 0.43. Alle Volumina wurden mit der Software „Expert“ von Beckman Coulter berechnet. <sup>(a)</sup> = Werte mit CE-Expert berechnet, für eine Viskosität der Lösungen von 0.4364 [Menzinger et al., 2001].

#### 4.1.4 On-line Aufkonzentrierung mittels mizellarem Sweeping

Eine weitere Zielsetzung (Kap. 1, S.3., Punkt 1b) war die Erhöhung der Detektionssensitivität in der CE durch Anwendung von off-line und on-line Aufkonzentrierungstechniken. Dabei kam als on-line Methode das mizellare Sweeping zum Einsatz, das die Prinzipien der MEKC zur Aufkonzentrierung nutzt (vgl. Einleitung, S. 6).

Mit dieser Technik wurden Stoffe (s-Triazine, Phenylharnstoffe, PAH) unterschiedlichster Hydrophobizität ( $\log K_{OW}$  von 0.2 bis 6.5) getestet, um die Grenzen und Möglichkeiten der Methode kennenzulernen. Zur Normierung der quantitativen Daten wurden die Nachweisgrenzen (mg/l) mit dem molaren Absorptionskoeffizienten korrigiert, so dass ein vom Absorptionsmaximum unabhängiger Vergleich und somit eine direkte Korrelation der Nachweisgrenzen (mM) möglich war.

Zur theoretischen Vorhersagbarkeit des Aufkonzentrierungsverhaltens der Substanzen wurde  $\log K_{OW}$  und der Logarithmus des Kapazitätsfaktors ( $\log k$ ) in Beziehung gesetzt und mit drei weiteren Substanzen getestet. Diese Ergebnisse wurden mit den zuvor analysierten Stoffen verglichen.

Sweeping wurde in einem zweiten Schritt quantitativ mit einer off-line Aufkonzentrierungsmethode (SPE) verglichen.

##### 4.1.4.1 Sweeping mit s-Triazinen und Phenylharnstoffen

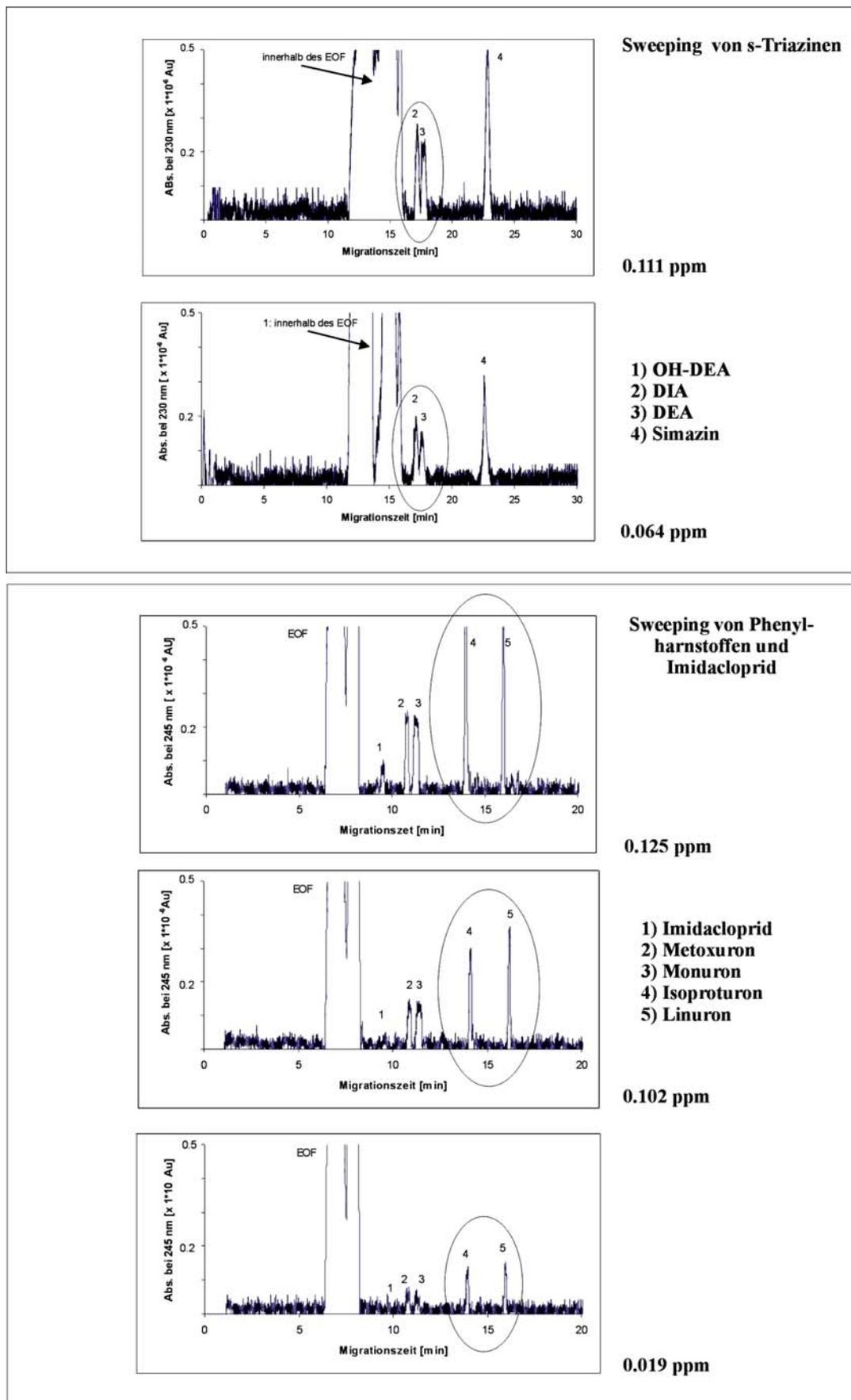
Eine Grundvoraussetzung für die On-line Aufkonzentrierung mittels Sweeping war die Leitfähigkeitshomogenität zwischen Probe und Puffer [Quirino, Terabe, 1999]. Zu diesem Zweck wurde die Leitfähigkeit der Probe auf die des Puffers eingestellt. Ausgehend von der PF-MEKC-Methode (s. Abschnitt 4.1.3), in der ein 80 mM Natriumboratpuffer, pH 9.2, 70 mM SDS und 14 % Methanol (=Mizellarpufer) verwendet wurde, wurde in der Sweeping-Technik ein modifizierter Puffer eingesetzt, wobei 100 mM Borat, pH 9.2, 100 mM SDS und 5 % n-Butanol zusammengemischt wurden. Dieser so hergestellte Puffer zeigte eine höhere Leitfähigkeit (ca. 2400  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) gegenüber dem mizellaren Puffer der PF-MEKC, die bei ca. 1400  $\mu\text{S}/\text{cm}$  lag.

Aus Messungen in PF-MEKC (UV, Abschnitt 4.1.1 ff) war bekannt, daß das Detektionslimit der CE generell gesehen, oberhalb von ca. 0.2 ppm lag. Deshalb machte es wenig Sinn, die Sweeping-Technik für höhere Konzentrationen anzuwenden, da die CE in der Lage war, diese Konzentrationen ohne Aufkonzentrierung zu detektieren. Aus diesem Grund war es wichtig der Frage nachzugehen, inwieweit Sweeping ab der Nachweisgrenze in der Lage war, das Detektionslimit einzelner Substanzen abzusenken.

Abbildung 13 zeigt die Elektropherogramme der Ergebnisse der On-line Aufkonzentrierung mittels Sweeping von vier s-Triazinen (OH-DEA, DIA, DEA und Simazin) und von 4 Phenylharnstoffen (Metoxuron, Monuron, Isoproturon, Linuron) und Imidacloprid.

Man erkennt deutlich im oberen Kasten, daß sich OH-DEA nicht auftrennte, sondern in der EOF – Zone verblieb; das konnte durch Zumischen des Standards zur vorhandenen Lösung bestätigt werden. Die anderen drei s-Triazine migrierten langsamer als die EOF – Zone. Betrachtete man die Hydrophobizitäten dieser vier s-Triazine, so fielen die verschiedenen log Kow auf, wonach OH-DEA einen Wert von 0.2, DIA: 1.1, DEA: 1.4 und Simazin von 2.3 besaßen (vgl. Tabelle 9). Das bedeutete, daß die Hydrophobizität des OH-DEA „nicht genügend“ war, um ausreichend effizient an die mizellare Phase unter den experimentellen Bedingungen anzudocken, bei DIA und DEA funktionierte das befriedigend, während dagegen sich Simazin deutlich abhob. Somit wurde Simazin als „hydrophobster Stoff“ in dieser Reihe nach den Prinzipien der MEKC (vgl. auch 3.1.2) am stärksten zurückgehalten und als letzte Substanz detektiert. Das „galt“ sowohl für die Trennung bei 0.111 als auch 0.064 ppm.

Die Elektropherogramme des zweiten Kastens der Abb.13 zeigen die Aufkonzentrierung von Imidacloprid, Metoxuron, Monuron, Isoproturon und Linuron bei 0.125, 0.102 und 0.019 ppm.



**Abb. 13** Sweeping von ausgewählten s-Triazinen, Phenylharnstoffen und Imidacloprid ( $t_{inj} = 150$  sec)

Die Absorptionsmaxima der untersuchten s-Triazine rangierten um 220 nm (bis auf OH-DEA und DEA). Problematisch war jedoch die Tatsache, aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsmaxima der in Abbildung 13 unterer Kasten untersuchten Stoffe (Imidacloprid: 269 nm, Monuron: 245 nm, Isoproturon: 242, Linuron: 210 nm und Metoxuron 206 nm) in einem Diagramm darzustellen. Ein direkter visueller Vergleich war untereinander nicht möglich. Deswegen wurden zunächst – der Einfachheit wegen – alle Elektropherogramme auf Basis des Absorptionsmaximums von Monuron aus der CE - Software in Microsoft Excel exportiert.

Unter Einbezug des molaren Absorptionskoeffizienten jeder einzelner analysierter Substanz sollte es möglich sein, eine Normierung zu schaffen, um dadurch quantitative Daten von Substanzen mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima vergleichen zu können.

Als erstes Zwischenergebnis ließ sich festhalten, daß innerhalb der untersuchten s-Triazine Simazin am stärksten an die mizellare Phase andockte, während dagegen OH-DEA aufgrund der geringsten Hydrophobizität in der EOF - Zone verblieb. Hatte das einen Einfluß auf das Aufkonzentrierungsverhalten der Substanzen?

Zweitens ließ sich resümieren, daß aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsmaxima der in Abb. 13 unteren Kasten untersuchten Stoffe keine direkte Aussage gemacht werden konnte, was im Falle der s-Triazine möglich war. Deshalb sollte ein Bezug auf den molaren Absorptionskoeffizienten weiterhelfen. Das wurde im nächsten Abschnitt behandelt.

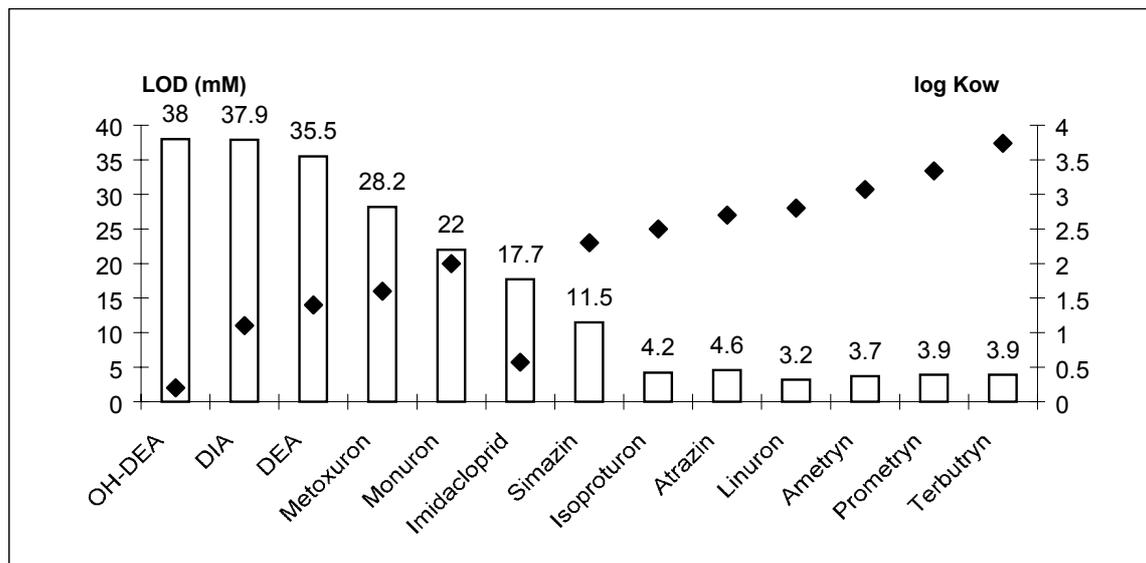
#### **4.1.4.2 Quantitative Effekte; Normierung mit molarem Absorptionskoeffizienten**

Wie in Abschnitt 4.1.4.1 näher ausgeführt, mußte zur Nivellierung der molare Absorptionskoeffizient einbezogen werden. Um einen großen Bereich verschiedener Substanzen abzudecken, wurden nicht nur die im vorherigem Abschnitt dargestellten Stoffe der Sweeping-Technik unterworfen, sondern auch weitere, die zusammen in Tab. 9 aufgelistet sind. Unter dem Aspekt der Quantifizierung wurde die Nachweisgrenze (LOD) ermittelt.

Analyt	LOD [ppm] S/N=3	R <sup>2</sup> [n=4]	Abs.max bei pH 9.2 in Mizellarpuffer	Molarer Absorptionskoeffizient	Log K <sub>ow</sub>
<b>Linuron</b>	0.024	0.973	210	32915	2.8*
<b>Metoxuron</b>	0.044	0.9181	206	42357	1.6*
<b>Monuron</b>	0.029	0.9618	245	28856	2.0*
<b>Isoproturon</b>	0.037	0.9777	242	23274	2.5**
<b>Imidacloprid</b>	0.073	0.9729	269	28082	0.57**
<b>Atrazin</b>	0.023	0.9981	221	44297	2.7***
<b>Ametryn</b>	0.018	0.9535	219	47007	3.07***
<b>Prometryn</b>	0.023	0.9535	221	42148	3.34***
<b>Terbutryn</b>	0.038	0.9754	222	44578	3.7***
<b>Simazin</b>	0.064	0.9696	221	36290	2.3***
<b>OH-DEA</b>	(1) 0.29 (2) n.b.	(1) 0.9921 (2) n.b.	207	22192	0.2***
<b>DIA</b>	(1) 0.15 <sup>x</sup> (2) n.b.	(1) 0.9935 (2) n.b.	213	43815	1.1*
<b>DEA</b>	(1) 0.18 <sup>x</sup> (2) n.b.	(1) 0.9794 (2) n.b.	209	42538	1.4*

**Tab. 9** Sweeping von s-Triazinen Phenylharnstoffen und Imidacloprid in quantitativer Hinsicht (Nachweisgrenze: LOD in ppm, R<sup>2</sup>) sowie Absorptionsmaximum in Mizellarpuffer bei pH 9.2, molarer Absorptionskoeffizient und Log K<sub>ow</sub>; die Berechnung des Molaren Absorptionskoeffizienten erfolgte aus dem Bouguer-Lambert-Beerschen Gesetz:  $A = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot b$  mit A = Absorption,  $\varepsilon(\lambda)$  = Proportionalitätsfaktor: molarer Absorptionskoeffizient [l.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>], c = molare Konzentration [mol.l<sup>-1</sup>], b = Schichtdicke [cm]. \*) Finizio et al., 1997 \*\*) Bahadir et. al, 2000, \*\*\*) Pacakova et al. 1996, n.b. = nicht bestimmbar mittels Sweeping, die Nachweisgrenze wurde in PF-MEKC ermittelt (siehe Abschnitt 4.1.1 ff), (1) PF-MEKC (UV), (2) Sweeping; Aufgrund der „Inlinearität“ der Quantifizierungsgeraden von DIA zur Ermittlung des LOD mittels der Sweeping-Technik wurden die PF-MEKC (UV) – Daten eingesetzt.

Die in Tabelle 9 dargestellte Nachweisgrenze der einzelnen Substanzen wurde von ppm [mg/l] in mM unter Einbezug der molaren Masse umgerechnet und der so errechnete Wert schließlich mit dem Absorptionskoeffizienten multipliziert. Somit erhielten wurden die in Abb. 14 dargestellten Werte erhalten.



**Abb. 14:** Korrelation der Nachweisgrenze (LOD [mM, korrigiert]) und log Kow von 13 verschiedenen Substanzen. Ursprung der log  $K_{ow}$ : siehe Tabelle 9.

Ausgehend von Abbildung 14 war eine Korrelation zwischen dem n – Oktanol - Wasser-Verteilungskoeffizienten log Kow und dem korrigierten Detektionslimit jeder einzelner Substanz zu sehen. DIA, DEA und insbesondere OH-DEA konnten mittels Sweeping nicht bestimmt werden. Die Nachweisgrenze von Simazin dagegen konnte aufgrund eines linearen Regressionskoeffizienten ermittelt werden. Man erkannte deutlich, daß der Sweeping-Effekt unter den experimentellen Bedingungen ab einem log Kow von ca. 1.6 „ansprach“, ab ca.2.5 bis ca. 3.4 Werte um 4 mM erreichte. Jedoch war die Nachweisgrenze von Imidacloprid anders, als es sich von dem log Kow erwarten ließ. Laut den vorherigen Überlegungen dürfte sich Imidacloprid mit einem log Kow von 0.57 nicht oder nur schlecht aufkonzentrieren lassen, der hier mit 17.7 mM ermittelte Wert würde einem log Kow von 2.1 entsprechen.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob Sweeping bei Verwendung stärker hydrophober Stoffe (d.h. log Kow > 4) verwendet werden konnte. War hier eine weitere Absenkung des Detektionslimits zu erwarten?

Ab diesem Hydrophobizitätsbereich wurden polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) eingesetzt und hinsichtlich ihres Sweeping-Verhaltens unter den experimentellen Bedingungen bei pH 9.2 untersucht.

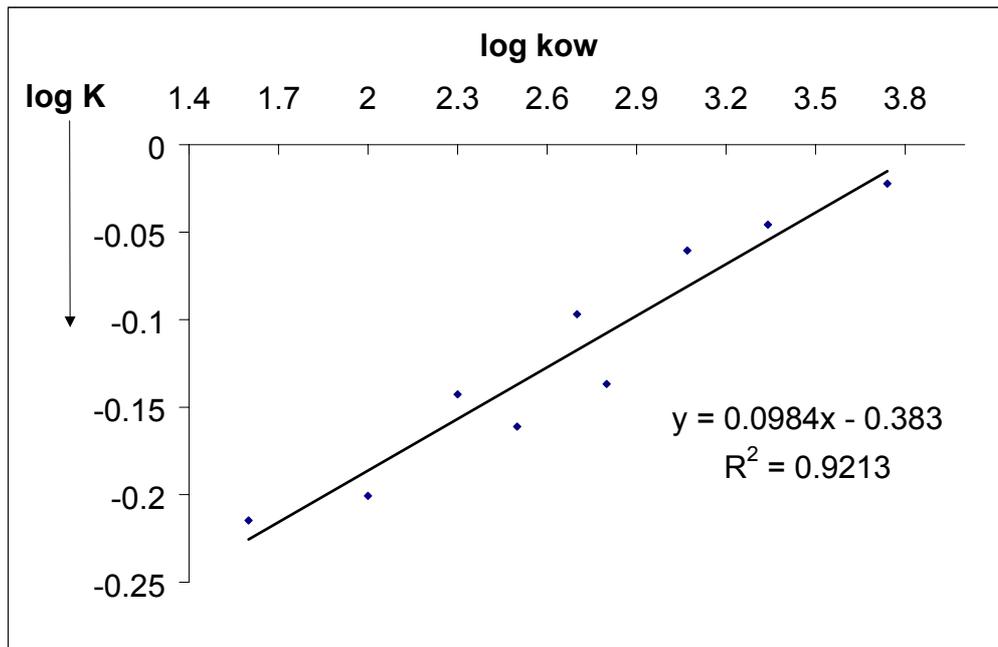
Die Tabelle 10 gibt einen Überblick über die untersuchten PAH: Fluoren (FLU), Phenanthren (PHE), Fluranthen (FLA), Benzo[a]pyren (BAP) und Dibenz[a,h]anthracen (DAA).

Analyt	LOD [mg/l] S/N=3	R <sup>2</sup> [n=4]	LOD [mM]	Abs.max bei pH 9.2 in Mizellarpuffer	Molarer Absorptionsko- effizient	Log K <sub>ow</sub>
Fluoren (FLU)	0.0192	0.9877	6.8	205	25323	4.18*
Phenanthren (PHE)	0.0131	0.9539	7.7	250	62469	4.46**
Fluranthen (FLA)	0.0135	0.9516	5.1	235	54654	5.33**
Benzo[a]pyren (BAP)	0.0211	0.9956	6.8	295	40671	6.15**
Dibenz[a,h]anthracen (DAA)	0.0210	0.9285	7.6	296	83118	6.5**

**Tab.10:** Quantifizierungsdaten für fünf mit der Sweeping-Technik untersuchte PAH, \*) log K<sub>ow</sub> : [www.uvm.baden-wuerttemberg.de/baf\\_aweb/berichte/bs02/bs02108.htm](http://www.uvm.baden-wuerttemberg.de/baf_aweb/berichte/bs02/bs02108.htm) \*\*) log K<sub>ow</sub> : Bahadir et al., 2000.

Ab log K<sub>ow</sub> = 4 kam es zu keiner deutlichen Verbesserung des Aufkonzentrierungseffektes, der innerhalb der Reihe bis zu einem Wert von log K<sub>ow</sub> von 6.5 sich nahezu auf einen Wert hin nivellierte. Das hieß, PAH konzentrieren sich nicht besser auf als es sich von den Hydrophobizitätswerten erwarten ließ; die „Sweeping-Kapazität“ war mit dem Puffer erreicht.

Insgesamt bedeutete das, daß sich die Korrelation von log K<sub>ow</sub> und Aufkonzentrierungseffekt durch Sweeping innerhalb des Hydrophobizitätsbereiches log K<sub>ow</sub> 1.6 bis 3.7 bestätigen ließ. Innerhalb dieses Bereiches existierte eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Kapazitätsfaktors (siehe Abschnitt 3.1 ff) und dem Logarithmus des n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (Abb. 15).



**Abb. 15:** Zusammenhang zwischen Logarithmus des n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (log Kow) und Logarithmus des Kapazitätsfaktors k („klein k“) unter den experimentellen Bedingungen (siehe Text).

Unter Einbezug der Linearität des in Abbildung 15 gezeigten Zusammenhangs konnte unter den experimentellen Bedingungen vorhergesagt werden, welcher Kapazitätsfaktor sich aufgrund eines gewissen log Kow (1.6 - 3.8) für die zu untersuchenden Substanzen ergab. Das soll Bestandteil des nächsten Abschnitts sein.

#### 4.1.4.3 Bestätigung und Voraussage der Aufkonzentrierung

Anhand von weiteren Standardsubstanzen mußte getestet werden, ob diese Vorhersagbarkeit in der „Realität“ funktionierte.

Hierzu wurden drei Substanzen mit unterschiedlichen Hydrophobizitätseigenschaften eingesetzt (siehe Tab. 11), aber mit solchen, die innerhalb des linearen Bereich der Abbildung 15 lagen.

Substanz	Log Kow	Kapazitätsfaktor („klein k“; experimentell ermittelt)	Kapazitätsfaktor („groß K“; errechnet aus Beziehung log Kow und log k; Abb. 15)	Abweichung [%]
Atraton	2.4*	0.74	0.71	4,0
Ethofumesat	2.7**	0.83	0.76	8,4
Alachlor	3.1*	0.86	0.84	2,3

**Tab. 11:** Experimentell ermittelte und errechnete Kapazitätsfaktoren von drei verschiedenen Substanzen. \*) Finizo et al., 1997, \*\*) Bahadir et. al, 2000.

Eine Übereinstimmung des experimentell ermittelten und errechneten Kapazitätsfaktors fanden wir besonders bei Alachlor, Atraton, bei Ethofumesat waren Abweichungen festzustellen.

Die Abweichungen des theoretisch ermittelten gegenüber dem experimentell bestimmten Kapazitätsfaktor ließen sich durch die mit  $r^2 = 0.9213$  „geringe“ Linearität [n=9] des in Abbildung 15 gezeigten Zusammenhangs erklären.

Mit Hilfe dieser Substanzen war es möglich, Aussagen über die „Qualität“ der experimentell und ermittelten Werte zu machen. Eine exakte Übereinstimmung von theoretischen und praktischen Werten konnte nicht gefunden werden, jedoch waren die Werte exakt genug, um eine Voraussage der Aufkonzentrierung machen zu können.

Für weitere Berechnungen war die Beziehung Kapazitätsfaktor k („klein k“) und Verteilungskoeffizient („groß K“) in folgender Gleichung wichtig:

$$9) \quad k = K * v * ([S] - CMC)$$

mit  $v$  = molares Volumen Tensid, hier : 0,0002515 l/ mmol [nach Kuhn, S. 196], [S] = totale Tensidkonzentration, hier 47.1 mM, CMC = kritische Mizellarkonzentration, 8.1 mM.

Nach Auflösung der Gleichung nach dem Verteilungskoeffizienten K und Einsetzen des Kapazitätsfaktors k aus Tabelle 11 konnte die Konzentration der Analyten berechnet werden. Unter Einbezug der molaren Masse der jeweiligen Substanz ergab sich folgende Tabelle 12:

Substanz	LOD gemessen [mg/l]	R <sup>2</sup> [n=4]	K <sub>experimentell</sub>	Konzentration [mg/l]	K <sub>errechnet</sub>	Konzentration [mg/l]
Atraton	0.0157	0.9974	74.5	0.0157	71.5	0.0151
Ethofumesat	0.024	0.9426	83.5	0.0239	76.5	0.0219
Alachlor	0.029	0.9616	86.5	0.0233	84.5	0.0228

**Tab. 12:** Bestimmung der Konzentration dreier untersuchter Substanzen auf Basis des experimentell bestimmten und errechneten Kapazitätsfaktor  $k$  nach Umformung von Gleichung 9 und Auflösen nach Verteilungskoeffizient  $K$ ;  $K_{\text{experimentell}}$ : aus gemessenen Migrationszeiten errechnet;  $K_{\text{errechnet}}$ : aus Geradengleichung zu Abb. 15 berechnet.

Um einen direkten Vergleich mit den korrigierten Nachweisgrenzen der in Abschnitt 4.1.4.2 untersuchten Stoffe machen zu können, wurde unter Einbezug der molaren Masse und des molaren Absorptionskoeffizienten die nachweisbare (errechnete) und die gemessene Konzentration korrigiert (Tab. 13):

Substanz	Abs.max bei pH 9.2 in Mizellarpuffer	Molarer Absorptionskoeffizient	LOD <sub>gemessen</sub> [n=4] [mM]	„LOD“ <sub>errechnet</sub> [mM]	Log K <sub>ow</sub>
Atraton	217	46114	4.1	3.3	2.4
Ethofumesat	223	42569	3.6	3.3	2.7
Alachlor	203	37037	4.0	3.1	3.1

**Tab. 13:** Aus den errechneten Kapazitätsfaktoren und Verteilungskoeffizienten erhaltenen nachweisbaren Konzentrationen („LOD“<sub>errechnet</sub>) sowie der gemessenen Nachweisgrenze (LOD<sub>gemessen</sub>: bei S/N =3).

Verglich man die Nachweisgrenzen, die sich sowohl aus den experimentell und errechneten Kapazitätsfaktoren der untersuchten drei Substanzen ergaben, so traten Übereinstimmungen zwischen den in Abbildung 15 dargestellten Stoffen und den schräg gedruckten Werten in Tab. 13 auf. Eine Vorhersagbarkeit des Aufkonzentrierungsverhaltens unter den experimentellen Bedingungen war somit möglich.

Jedoch sollte bei der Wahl des Analyten auf das Absorptionsmaximum geachtet werden, da bei schwach absorbierenden Substanzen die Integration erschwert und sehr ungenau ist. Für die Quantifizierung von Metazachlor ( $\lambda_{\max} = 194 \text{ nm}$ ) konnte dies festgestellt werden, so daß dieser Stoff nicht in die Ausführungen mitaufgenommen werden konnte.

Eine Diskussion betreffend der Möglichkeiten und Limitationen der Sweeping-Technik soll im Anschluß nach der Off-line Aufkonzentrierung zusammen mit der Festphasenextraktion (SPE) gemacht werden.

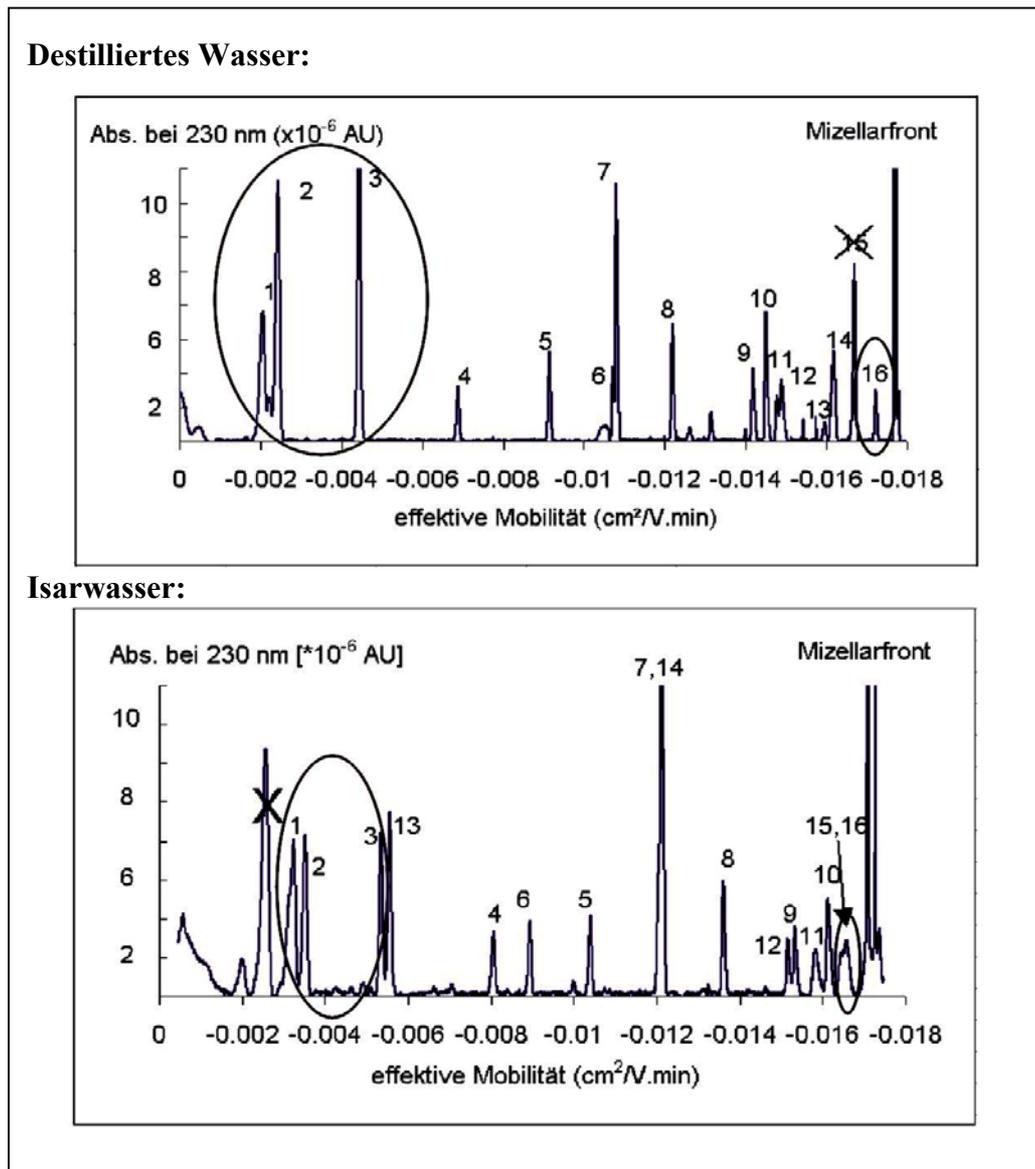
#### **4.1.5 Off-line Aufkonzentrierung mittels Festphasenextraktion (SPE)**

##### **4.1.5.1 Beschreibung qualitativer Effekte**

Zwei Wasserproben (destilliertes Wasser und Isar-Wasser, entnommen 19.9.2001 in Freising) wurden mit einem aliquoten Teil einer 16 s-Triazin-Herbizide beinhaltender Mischung versetzt, der Festphasenextraktion unterworfen und mittels PF-MEKC (UV; vgl. Abschnitt 4.1.1 ff) vermessen (Abb. 16).

Verglich man beide Proben hinsichtlich ihres Aufkonzentrierungsverhaltens, so wurden Unterschiede deutlich. Während in der destillierten Wasserprobe die Reihenfolge der Pestizide - wie in Abschnitt 4.1.1 ff beschrieben - eingehalten wurde - , war in der Isar-Wasserprobe, die Reihenfolge nicht dieselbe, nur Peak 1,2,3 stimmten überein.

Auffallend war der starke Hintergrund der Isarprobe. Durch Spiken von Huminstoffen zur destillierten Wasserprobe konnte keine Veränderung der Reihenfolge beobachtet werden. In der destillierten Wasserprobe trat zusammen mit Peak 15, was Prometryn darstellte, eine weitere Substanz hervor, die mit Prometryn überlappte. Es stellte sich jedoch im nachhinein heraus, daß die Kapazität des Ionenaustauschers zur Herstellung von destilliertem Wasser erschöpft war.



**Abb. 16:** Festphasenextraktion zweier mit 16 s-Triazin-Herbiziden versetzter Wasserproben, Messung in PF-MEKC (UV): Bedingungen: siehe Abschnitt 4.1.1 ff; oben: destilliertes Wasser, unten Isar-Wasser vom 19.9.2001. Konzentration: hier 5 ppb; Bezeichnung der Analyte: 1) OH-DEA, 2) DIA, 3) DEA, 4) OH-Simazin, 5) Simazin, 6) OH-Atrazin, 7) Atraton, 8) Atrazin, 9) OH-Propazin, 10) Ametryn, 11) Propazin, 12) Sebuthylazin, 13) OH-Terbuthylazin, 14) Terbuthylazin, 15) Prometryn, 16) Terbutryn

#### 4.1.5.2 Quantitative Beobachtungen

Die Nachweisgrenzen der untersuchten Pestizide (destilliertes Wasser, Isarwasser) wurden mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3 bestimmt. Diese sind in Tab. 14 dargestellt.

Zwischen destillierter Wasser- und Isarprobe sah man Unterschiede in den Nachweisgrenzen. Während in der dest. Wasserprobe zwischen 0.03 und 0.17  $\mu\text{g/l}$  bestimmt werden konnten,

ließen sich in der Isarprobe nur 0.25 bis >1 µg/l nachweisen. Vermutlich ließe sich das durch den Hintergrund erklären, der ebenso starken Einfluß auf die Migrationszeiten der Analyten hatte.

Substanz	Dest. Wasser		Isarwasser	
	LOD [µg/l]	R <sup>2</sup> [n=4]	LOD [µg/l]	R <sup>2</sup> [n=4]
OH-DEA	0.04	0.9919	0.25	0.9800
DIA	0.03	0.9967	0.77	0.9813
DEA	0.04	0.9942	0.60	0.9813
OH-Simazin	n.b.	n.b.	0.52	0.9892
Simazin	0.11	0.9622	0.38	0.8630
OH-Atrazin	n.b.	n.b.	1.11	0.9229
Atraton	0.04	0.8956	0.62	0.9870
Atrazin	0.07	0.9548	n.b.	n.b.
OH-Propazin	0.07	0.8309	n.b.	n.b.
Ametryn	0.08	0.9925	0.90	0.9868
Propazin	0.13	0.8723	0.48	0.9497
Sebuthylazin	0.06	0.8700	>1	n.b.*
OH-Terbuthylazin	n.b.	n.b.	>1	n.b.*
Terbuthylazin	0.07	0.9881	>1	n.b.*
Prometryn	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Terbutryn	0.17	0.9781	n.b.	n.b.

**Tab. 14:** Bestimmung der Nachweisgrenzen von zwei verschiedenen Wasserproben (nach Spiken auf Isarwasser und destilliertem Wasser) links: dest. Wasser., rechts: Isarwasser; n.b. = nicht bestimmt, \*) = kleinere Konzentrationen als 1 µg/l der untersuchten Analyte konnten in den Elektropherogrammen nicht nachgewiesen werden, somit war es auch nicht möglich, eine Linearitätskurve zur Ermittlung der Nachweisgrenze zu erstellen.

Mit der Festphasenextraktion war es möglich, abhängig vom Hintergrund der Wasserproben zwischen 0.03 – 0.17 und 0.25 – 1.11 µg/l nachzuweisen.

#### 4.1.6 Vergleich von mizellarem Sweeping und SPE- ein Ausblick

Während den Messungen kristallisierte sich die Einfachheit der Sweeping-Technik heraus, nur die Leitfähigkeit der Probe mußte auf die des Mizellarpuffes eingestellt werden. Die SPE-Technik war „aufwendiger“, verlangte mehr Vorbereitung.

Die SPE erreichte zum großen Teil in den Experimenten die Grenzwerte der Trinkwasserverordnung, die mit 0.1 µg/l für ein einzelnes und 0.5 µg/l für die Summe der Pestizide festgesetzt sind [TrinkwVO.]. Die Sweeping-Nachweisgrenzen lagen deutlich unter den „normalen“, nicht aufkonzentrierten Werten. Die Grenzwerte der Trinkwasserverordnung wurden nicht erreicht.

Ein weiterer wichtiger Nachteil trat bei der Überlegung hervor, Sweeping mit ESI-MS zu koppeln. Die Sweeping-Technik sollte nicht mit dem ESI-MS kombiniert werden, da wie in der MEKC eine mögliche Kontamination von niedermolekularen Tensiden im ESI-Interface (vgl. Abschnitt 4.3.1) stattfinden könnte. Isoo et. al. zeigte, daß Sweeping mit APCI-MS gekoppelt werden konnte [Isoo et al., 2001]. Dabei konnten im Falle des 3,4-Dichloranilins 0.6 ppm und im Falle des Diisopropylphthalat (DIIP) 0.4 ppm im SIM-Modus *geschätzt (!)* werden. Verglichen zu unseren Analysenwerten (Abschnitt 4.1.4.2 ff) waren die Werte von Isoo et. al. sehr hoch, was auf eine geringe Sensitivität des APCI-MS schließen ließ. Demnach erschien für uns die Kopplung Sweeping mit APCI-MS nicht sinnvoll, da die CE allein (ohne Sweeping) in der Lage war, Konzentrationen um 0.1-0.2 ppm in PF-MEKC (UV, vgl. 4.1.1) nachzuweisen.

Aufgrund der „geringen“ Aufkonzentrierungssensitivität der Sweeping-Technik im Vergleich zur Festphasenextraktion, erschien eine Anwendung auf Realproben nicht sinnvoll. Denn die verdünnte Probe müßte mit Hilfe von Puffer auf die Leitfähigkeit des Mizellarpuffes eingestellt werden, was eine weitere Verdünnung bewirkt. Eine Kombination von Sweeping und SPE erschien aufgrund der Rückverdünnung der Probe in der SPE nicht sinnvoll. Im Rahmen dieser Doktorarbeit aber wurden die Grenzen und Möglichkeiten einer on-line Aufkonzentrierungsmethode diskutiert. Die SPE war/ist eine off-line-Methode, die für Routinemessungen von Realproben anwendbar ist/war, mit erreichbaren Nachweisgrenzen, die die Trinkwasserverordnung fordert.

## 4.2 Übertrag der PF-MEKC-Methode (UV) zur Analyse von s-Triazin-Herbiziden mittels CE-ESI-MS

In PF-MEKC (UV-Modus, ohne MS) wurde eine Methode zur Analytik von 16 s-Triazin-Herbiziden entwickelt (siehe Abschnitt 4.1.1). Im folgenden soll deutlich gemacht werden, was beim Übertrag dieser „UV-Methode“ auf CE-ESI-MS beachtet werden mußte, welche Probleme auftraten und wie diese gelöst werden konnten. Anschließend wurden die Analyten in PF-MEKC-ESI-MS quantifiziert und die ermittelten Daten mit den UV-Werten verglichen. Die quantitativen ESI-MS-Daten wurden anhand der Spraystabilität näher betrachtet.

### 4.2.1. Voraussetzungen

Im Vergleich zur klassischen MEKC wird in der PF-MEKC nur ein bestimmter Teil der Kapillare mit Mizellarpuffer befüllt, um eine Kontamination des MS durch das niedermolekulare Tensid SDS zu verhindern, das zudem zu einer Reduktion der Signalintensität führt (siehe Abschnitt 3.1.2).

Ausgehend von pH 9.2, in der die „UV-Methode“ entwickelt wurde, wurden die s-Triazin-Herbizide Desisopropylatrazin (DIA,  $m/z = 174$ ), Atrazin ( $m/z = 216$ ) und Terbutryn ( $m/z = 242$ ) in einem 10 mM Natriumboratpuffer und 30 % Kapillarfüllung in PF-MEKC-ESI-MS getrennt. Hervorzuheben war, daß die genannten Pestizide in der klassischen MEKC pH 9.2 die Rahmenbedingungen für die Analyse der 16 Substanzen angaben, DIA wurde nahe des EOF-Peaks detektiert, Atrazin befand sich auf der „halben Strecke“ zwischen DIA und Terbutryn, Terbutryn sah man nahe der Mizellarfront; es hatte eine höhere Affinität zur pseudostationären Phase als die anderen zwei Testanalyten.

Zu einem späteren Zeitpunkt, nach Optimierung der Trennparameter im PF-MEKC-ESI-MS-Modus, wurden die restlichen Analyten zugemischt und quantifiziert. Zunächst aber sollte das Trennsystem so einfach wie möglich gehalten werden, um direkte Aussagen machen zu können, ohne am Anfang zuviel Wert auf einzelne Trennungen innerhalb der Substanzen legen zu müssen.

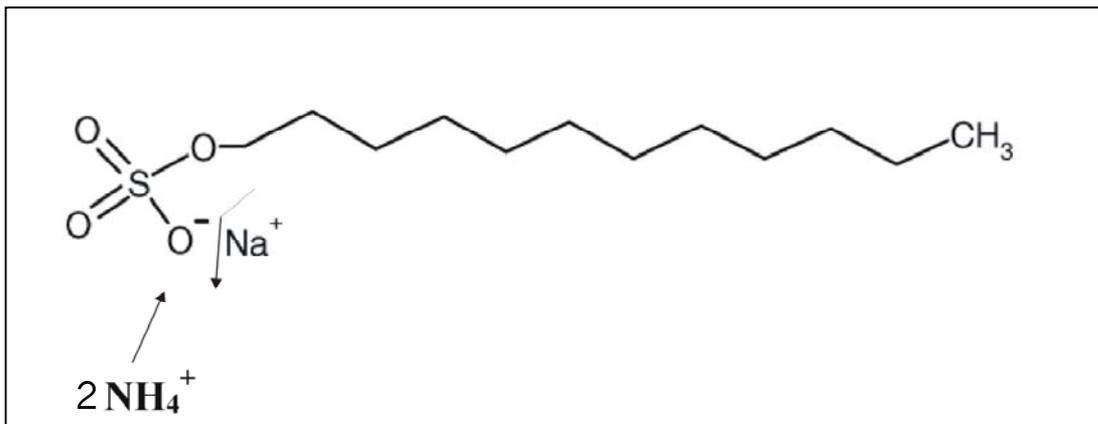
Für eine Trennung in PF-MEKC-ESI-MS war das direkte Erkennen der SDS-Kontamination wichtig. Zu diesem Zweck wurde SDS –Puffer direkt mittels „flow injection“ ins MS injiziert.

Es kristallisierte sich im Boratpuffer  $m/z = 311$  und im Ammoniumacetatpuffer  $m/z = 301$  heraus (Abbildung 18, Seite 70).

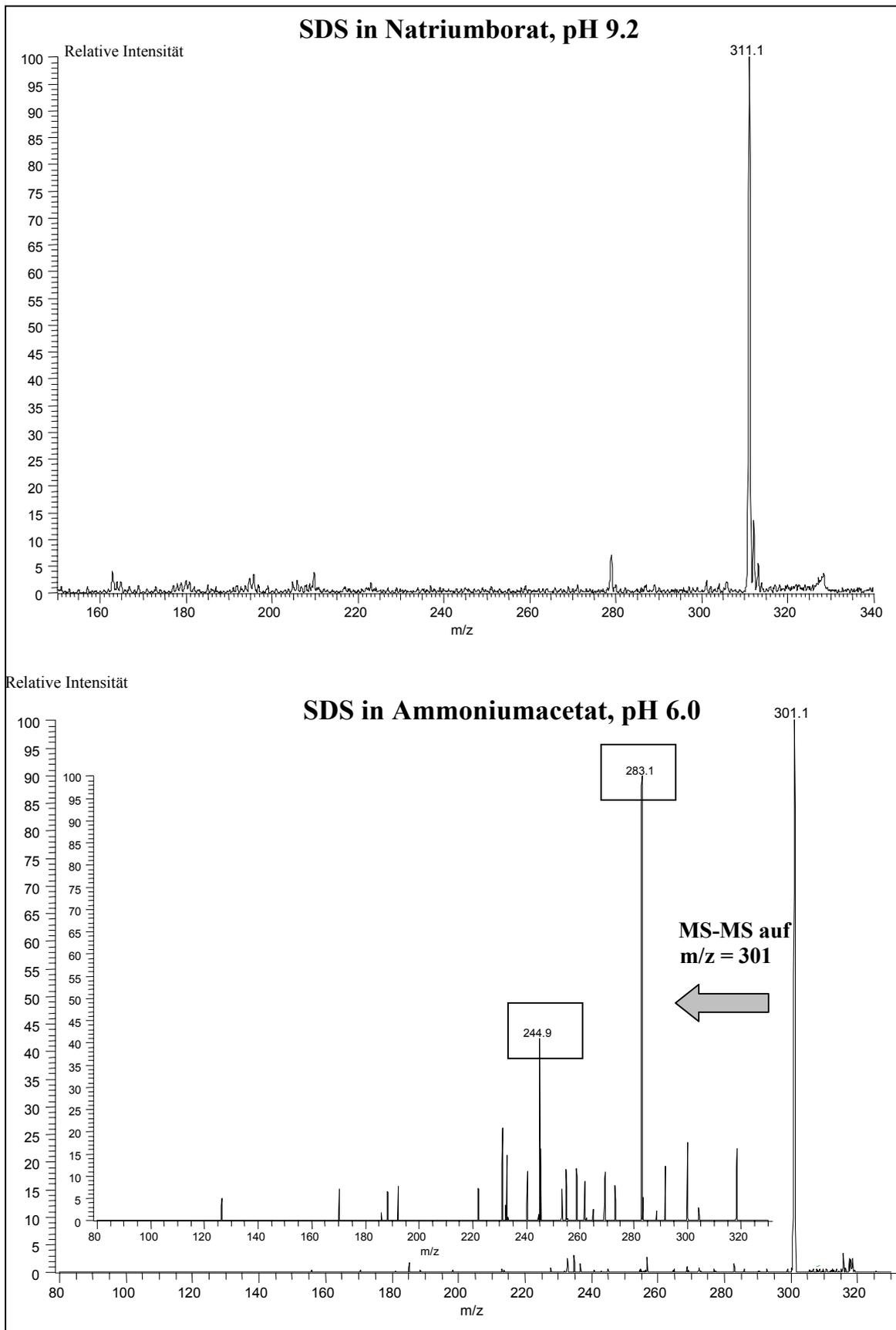
$M/z = 311$  in Natriumboratpuffer, pH 9.2 ließ sich durch eine zusätzliche Anlagerung eines Natriumions an das SDS-Molekül erklären  $[M+Na]^+$ .

Die Erklärung von  $m/z = 301$  in Ammoniumacetat, pH 6.0 gestaltete sich etwas schwieriger. Deshalb wurde SDS in diesem Puffer MS/MS-Experimenten unterworfen. Hierbei wurde neben dem Hauptpeak  $m/z = 301$   $m/z = 283$  und  $245$  gefunden.

$M/z = 301$  entstand bei Anwesenheit von Ammoniumionen durch Abstraktion des Natriumions und Anlagerung zweier Ammoniumionen (Abb. 17).



**Abb: 17:** Erklärung der Entstehung von  $m/z = 301$  in einem Ammoniumacetatpuffer, pH 6.0: Anlagerung von einem Ammoniumion unter gleichzeitiger Abstraktion des Natriumions, Molekulargewicht des SDS: 288 g/mol



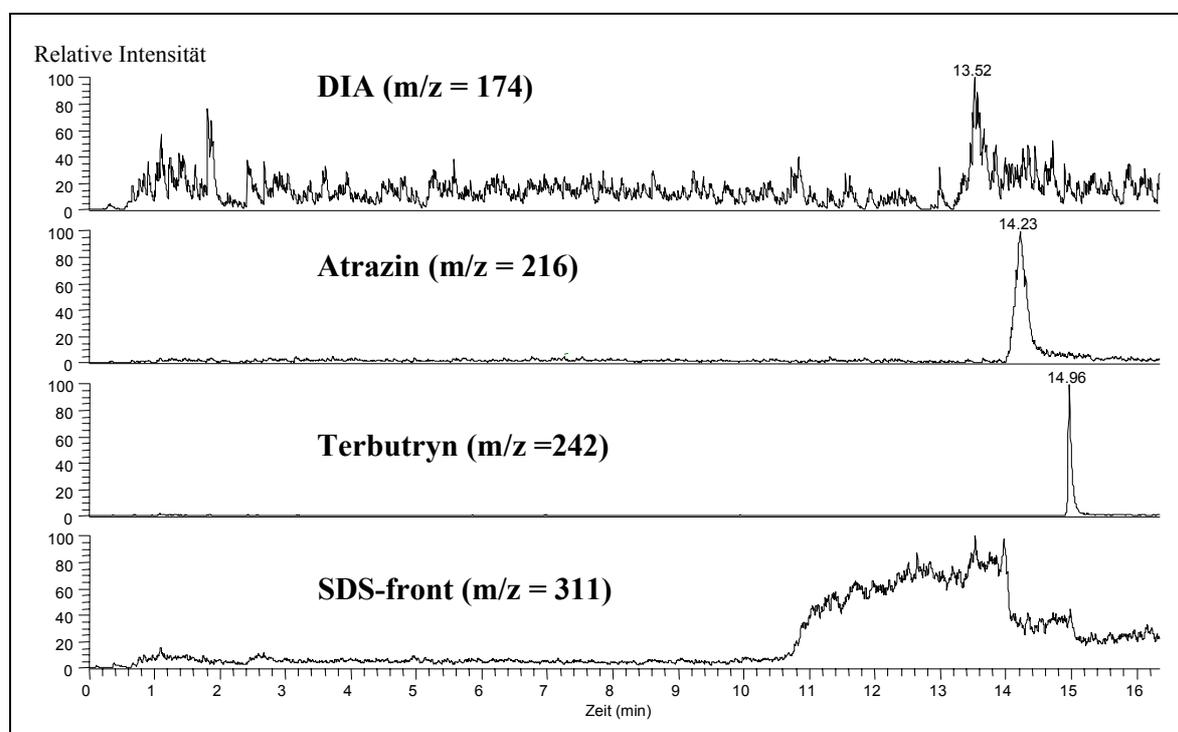
**Abb. 18:** SDS in Ammoniumacetatpuffer, pH 6.0 und Natriumboratpuffer, pH 9.2 (flow injection). Dabei kristallisierten sich zwei Hauptpeaks von SDS heraus:  $m/z = 301$  bzw.  $311$ . MS/MS auf  $m/z = 301$  ergab  $m/z = 283$  und  $m/z = 245$ .

$m/z = 283$  kann durch Abstraktion eines Ammoniumions aus dem zuvor im Elektrospray gebildeten Addukt und  $m/z = 245$  durch weitere Abstraktion von Ammoniumionen und Wasserstoffatomen entstehen (Tab. 15).

M/z	Korrespondierende Erklärung des gebildeten Quasimoleküls
288	$[M]^+$
311	$[M+Na]^+$
301	$[M-Na+2NH_4]^+$
283	$[M-Na+NH_4]^+$
245	$[M-Na-NH_4-2H]^+$

**Tab. 15:** Erklärung der Entstehungsweise der Adduktverbindungen bei pH 9.2 ( $m/z = 311$ ) und bei pH 6.0 ( $m/z = 301$ ); MS-MS-Produkte:  $m/z = 283$  und  $245$ ).

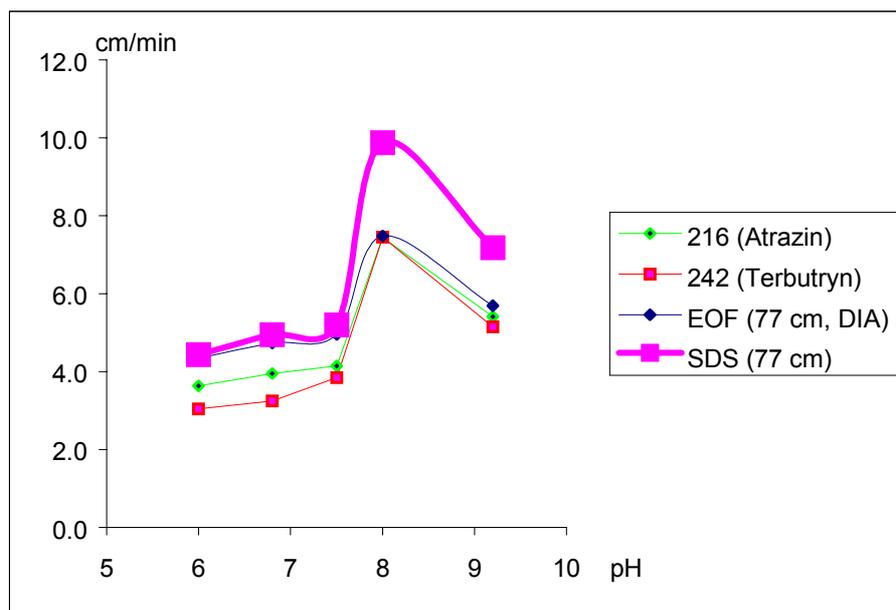
Wie aus folgender Abbildung 19 ersichtlich, erfolgte eine Trennung der drei s-Triazin-Herbizide (s.o.) bei pH 9.2, jedoch erst nachdem die SDS-Front ( $m/z = 311$ ) im MS detektiert wurde. Wie oben erwähnt, muß eine Trennung vor der SDS-Kontamination stattfinden.



**Abb. 19:** Trennung von DIA ( $m/z = 174$ ), Atrazin ( $m/z = 216$ ), Terbutryn ( $m/z = 242$ ) bei 10 mM Natriumborat, pH 9.2, 20 mM SDS (= Mizellarpuffer; 30% Füllung), Spur 4: SDS-Front; CE-Bedingungen: 5 sec. Injektion, 25 kV; ESI-MS-Bedingungen: ESI-kV: 4.8 mm, heated capillary 160 °C, sheath liquid: Methanol/Wasser/Ameisensäure: 50/49/1: 2.5  $\mu$ l/min, sheath gas = 0, full scan Modus.

Insgesamt bedeutete das, daß die Wanderungsgeschwindigkeit der SDS-Mizellen größer war als die der zu trennenden Substanzen.

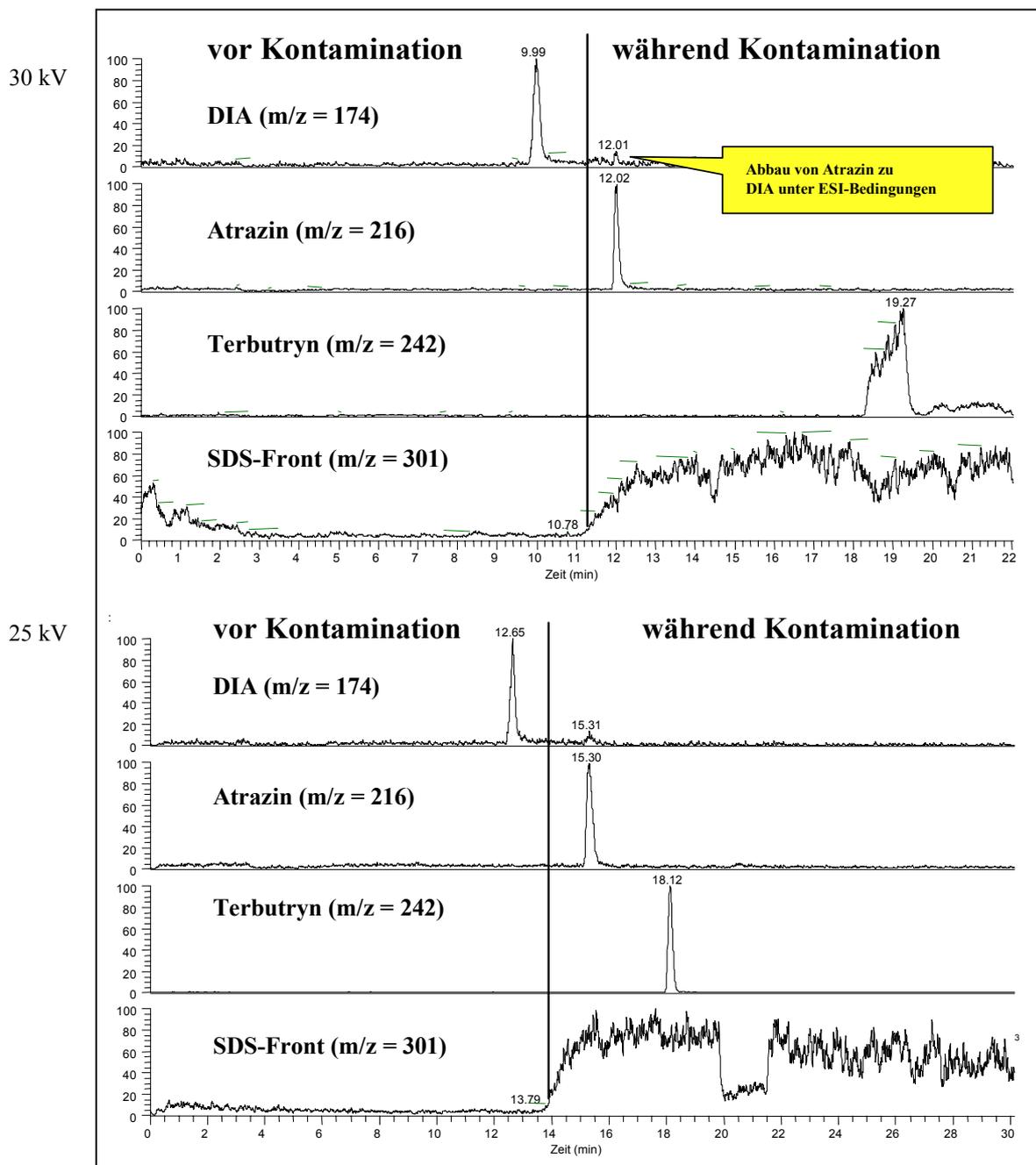
Nelson [Nelson et al., 1996] zeigte, daß Trennungen von ausgewählten s-Triazinen in PF-MEKC-ESI-MS durch Reduzierung des pH auf 6.8 möglich waren. Unsere Experimente zeigten aber, daß bei Erniedrigung des Puffer-pH-Wertes die Geschwindigkeit [cm/min] der SDS-Mizellen höher war als die der Analyten (Abb. 20) und somit Kontamination stattfand.



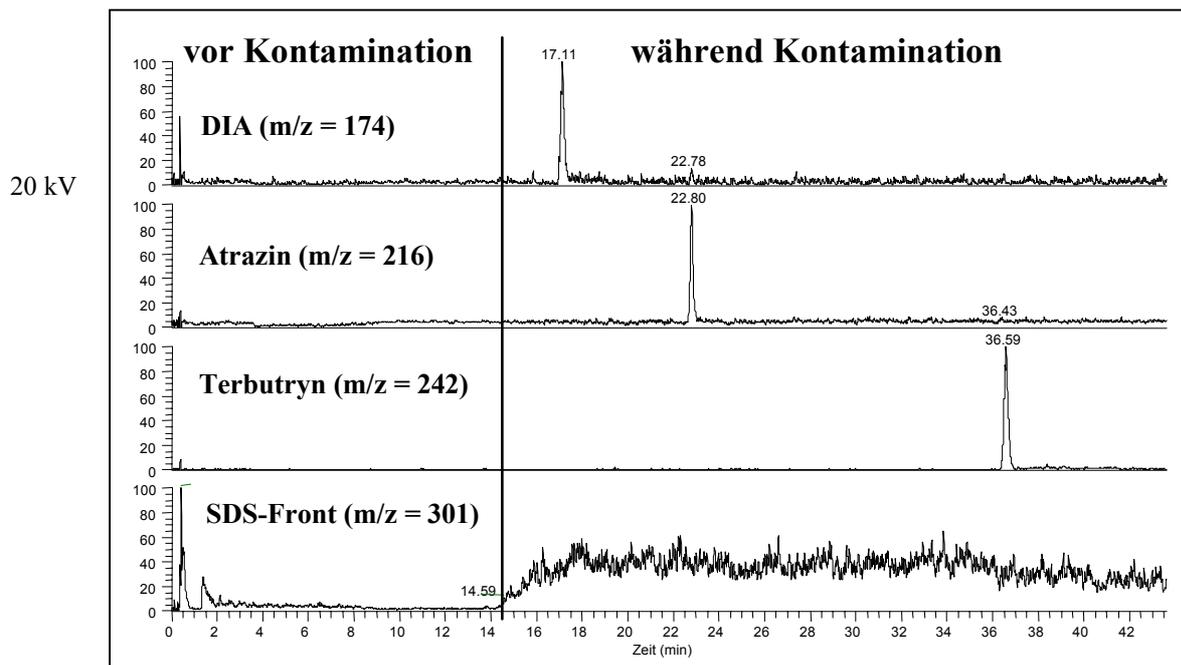
**Abb. 20:** Untersuchung von DIA ( $m/z = 174$ , EOF-Marker), Atrazin ( $m/z = 216$ ) und Terbutryn ( $m/z = 242$ ) bei verschiedenen pH-Werten, Darstellung in cm/min (pH 9-8: 10 mM Natriumborat, eingestellt mit 0.1 M NaOH, pH < 8 10 mM Ammoniumacetat, eingestellt mit 1%  $\text{NH}_3$  bzw. 0.1 M Essigsäure).

Somit führte eine Reduzierung des pH-Wertes ebenso zur Kontamination des MS durch SDS (in Ammoniumacetatpuffer  $m/z = 301$ ). Eine Reduzierung der Migrationsgeschwindigkeit der SDS-Mizellen mußte deshalb in Betracht gezogen werden. Yang [Yang et al., 1997] verwendete eine Konditionierung mit 1 M Salzsäure und erreichte dadurch eine Verlangsamung der Wanderungsgeschwindigkeit der Lösung und somit der SDS-Mizellen. Zur Anpassung dieser Konditionierung wurde statt 0.1 M Natronlauge 0.1 M Salzsäure angewandt.

Betrachtete man zusätzlich die Trennungen bei verschiedenen Spannungen und neutralem pH (6.8) nach Konditionierung mit 0.1 M Salzsäure, so ist bei 20 kV die Geschwindigkeit der SDS-Mizellen immer noch höher als die von den Analyten DIA, Atrazin und Terbutryn. Wird die CE-Spannung auf 30 kV erhöht, so sieht man deutlich, DIA migrierte schneller als die mizellare Phase. Die anderen zwei Substanzen Atrazin und Terbutryn wanderten langsamer und wurden deshalb erst nach der Kontamination mit SDS detektiert (Abb. 21).



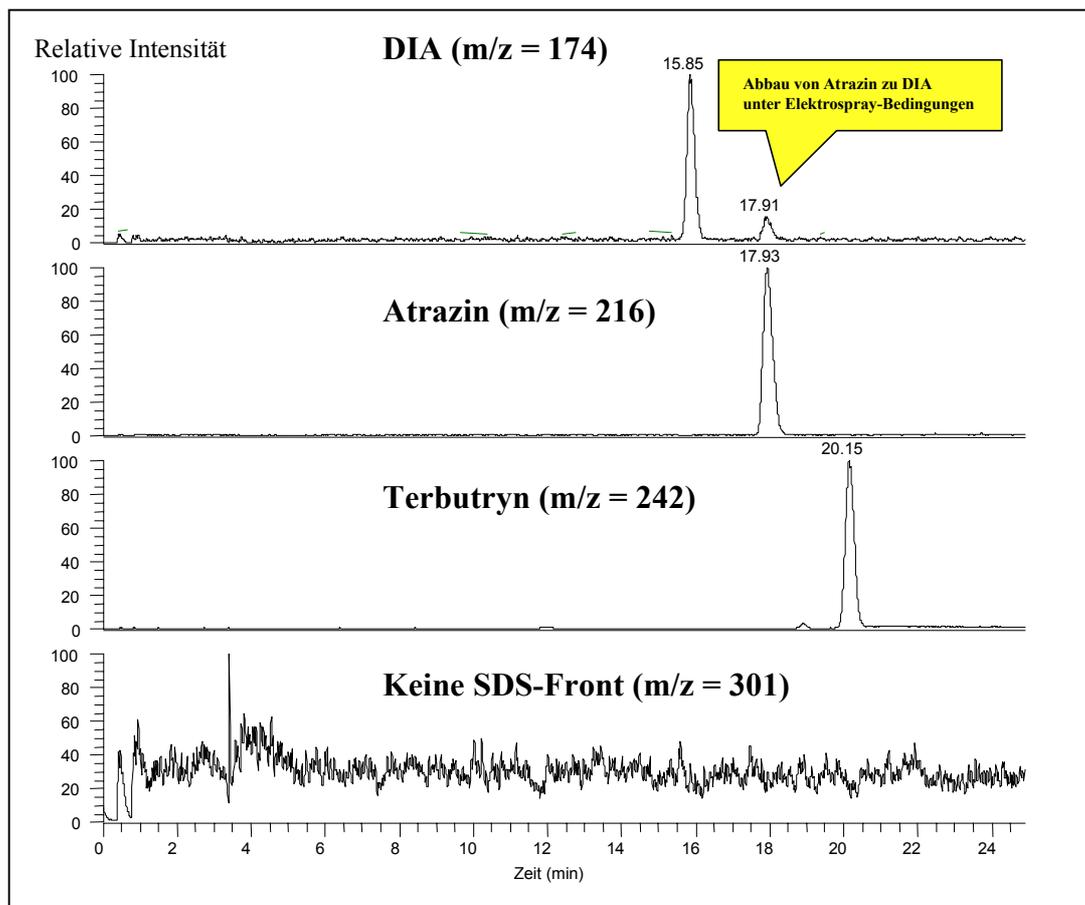
**Abb. 21:** Trennung von DIA ( $m/z = 174$ ), Atrazin ( $m/z = 216$ ) und Terbutryn ( $m/z = 242$ ), bei pH 6.8 und verschiedenen CE-Spannungen; die vierte Spur repräsentiert die beginnende SDS-Kontamination ( $m/z = 301$ ).



**Abb. 21 (Fortsetzung):** Trennung von DIA ( $m/z = 174$ ), Atrazin ( $m/z = 216$ ) und Terbutryn ( $m/z = 242$ ), bei pH 6.8 und verschiedenen CE-Spannungen; die vierte Spur repräsentiert die beginnende SDS-Kontamination ( $m/z = 301$ ).

Zusammenfassend ließ sich sagen, daß mit einer Reduzierung der CE-Spannung von anfänglich 30 kV auf 20 kV bei pH 6.8 keine Verlangsamung der Migration der SDS-Mizellen eintrat. Bei 25 und 30 kV trat nur der Analyt DIA vor der SDS-Kontamination aus der CE-Kapillare aus, während dagegen Atrazin kurz vor der SDS-Front migrierte. Terbutryn migrierte in keinem Fall vor der SDS-Front.

Der Puffer-pH mußte deshalb weiter auf 6.0 erniedrigt werden. Nach Zumischen von 5 (v/v) % Methanol zum Mizellar- und Hintergrund-Puffer konnte ein scharfer Terbutryn-Peak erhalten werden, der vor SDS-Front im MS erkannt werden konnte. Somit konnte auch die Affinität des Terbutryn zur pseudostationären Phase erniedrigt und die zur wäßrigen, umgebenden Phase erhöht werden. Eine Kontamination durch SDS trat nicht mehr ein (Abb. 22)



**Abb. 22:** Zumischen von 5 % Methanol zum Mizellar- und Background-Puffer ermöglichte eine scharfe Trennung auch des Terbutrynpeaks. Spur 4 stellt SDS dar, man erkennt keine Erhöhung der Basislinie wie in zuvor gezeigten Massenspektren. 1. Spur:  $m/z = 174$ , 2. Spur:  $m/z = 216$ ; 3. Spur:  $m/z = 242$ .

#### 4.2.2 Quantitative Analytik

Da die 3 Analyten (DIA, Atrazin, Terbutryn) nur die Rahmenbedingungen angaben, in denen die 16 s-Triazin-Herbizide detektiert werden konnten, war es wichtig, zusätzliche Wechselwirkungen untereinander durch Zumischen der restlichen Komponenten zu überprüfen. Die Trennbedingungen mußten deshalb geringfügig modifiziert werden. Mit 10 mM Ammoniumacetat, 10 % Methanol (=BGE) und 10 mM Ammoniumacetat, 20 mM SDS, 10 % Methanol (= mizellarer Puffer) bei 40 % Kapillaren-Füllung und einer CE-Spannung von 25 kV wurde eine Trennung erreicht. Hervorzuheben war allerdings, daß Terbutryn und Prometryn (jeweils  $m/z = 242$ ) nur zusammen in einem Peak ins MS gelangten.

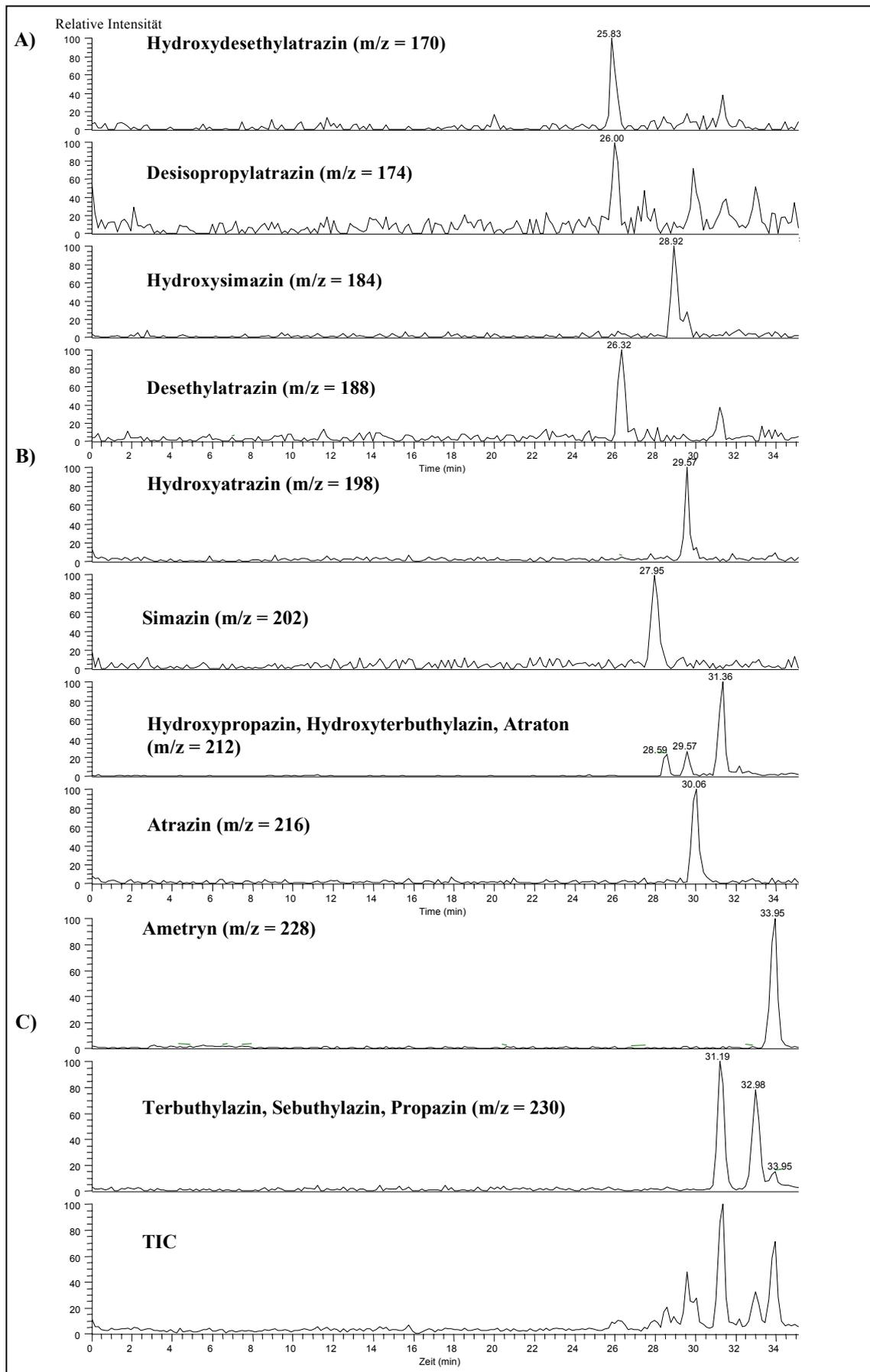
Die Quantifizierung der Analyten erfolgte nicht im Full – Scan -, sondern im Single Ion Monitoring (SIM)- Modus, in dem ganz spezifische Massen herausselektiert werden konnten. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, das Detektionslimit zu senken, da nicht alle ins MS kommende Ionen, sei es von der Pufferlösung oder sheath liquid, erfaßt wurden.

Für die Quantifizierung im SIM standen seitens der MS-Software 10 SIM-Kanäle zur Verfügung. Für die quantitative Bestimmung wurden die hydrophobsten Stoffe (Terbutryn und Prometryn) nicht herangezogen.

Im folgender Tabelle 16 wurden alle Testanalyten nach ihrer Masse per Ladung hin aufsteigend aufgelistet, die in PF-MEKC-ESI-MS quantifiziert wurden (Abb. 23).

Substanz-Name	m/z
Hydroxydesethylatrazin	170
Desisopropylatrazin	174
Hydroxydoxysimazin	184
Desethylatrazin	188
Hydroxyatrazin	198
Simazin	202
Hydroxypropazin Hydroxyterbuthylazin Atraton	212
Atrazin	216
Ametryn	228
Terbuthylazin Sebuthylazin Propazin	230

**Tab. 16:** Alle Analyten, die im PF-MEKC-SIM-ESI-MS Modus untersucht wurden sind



**Abb. 23:** Trennung von 14 s-Triazin-Herbiziden in PF-MEKC-ESI-MS, Single Ion Monitoring; dargestellt ist das Masspherogramm bei einer Konzentration von 5 ppm. Unterste Spur: TIC (Total ion current).

In der nachfolgend abgebildeten Tabelle 17 wurden die Quantifizierungsdaten der 14 untersuchten s-Triazin-Herbizide aufgelistet (Reihenfolge entspricht der Tabelle 16 sowie Abbildung 23).

M/z	R <sup>2</sup> [n=4]	LOD [ppm]	Rel STABW [%], Zeitskala [n=4]
170	0.983	1.5	2.8
174	0.9811	2.7	1.7
184	0.9908	0.64	3.3
188	0.9627	2.2	4.2
198	0.9476	1.3	2.5
202	0.9468	2.5	3.7
212	0.8202	0.74	4.2
212	0.8468	0.48	4.0
212	0.9963	0.31	4.4
216	0.9288	0.65	4.4
228	0.9737	0.33	4.1
230	0.953	0.52	4.9
230	0.9863	0.78	4.9
230	0.9701	2.8	n.d.

**Tab. 17:** Quantifizierung von 14 s-Triazin-Herbiziden, angegeben sind die Nachweisgrenzen (LOD in ppm) und die relative Standardabweichungen von 4 Messungen; Für Substanz 14 mit m/z = 230 wurde die relative Standardabweichung nicht bestimmt, da der Substanzpeak nur sehr klein war im Vergleich zu den anderen Peaks.

Insgesamt ließ sich festhalten, daß sich die Nachweisgrenzen der untersuchten Herbizide in PF-MEKC-ESI-MS von den Messungen im UV-Modus deutlich unterscheiden. Während in der „UV“-Methode Werte zwischen 0.1 und 0.3 ppm erreicht wurden (siehe Abschnitt 4.1f), lagen sie in der „MS“-Methode zwischen 0.3 und 2.8 ppm (SIM). Auch die relativen Standardabweichungen bewegten sich zu höheren Werten hin (1.7-4.9%).

### 4.2.3 PF-MEKC-ESI-MS mit hochmolekularen Tensiden: Ein Ausblick mit BBMA

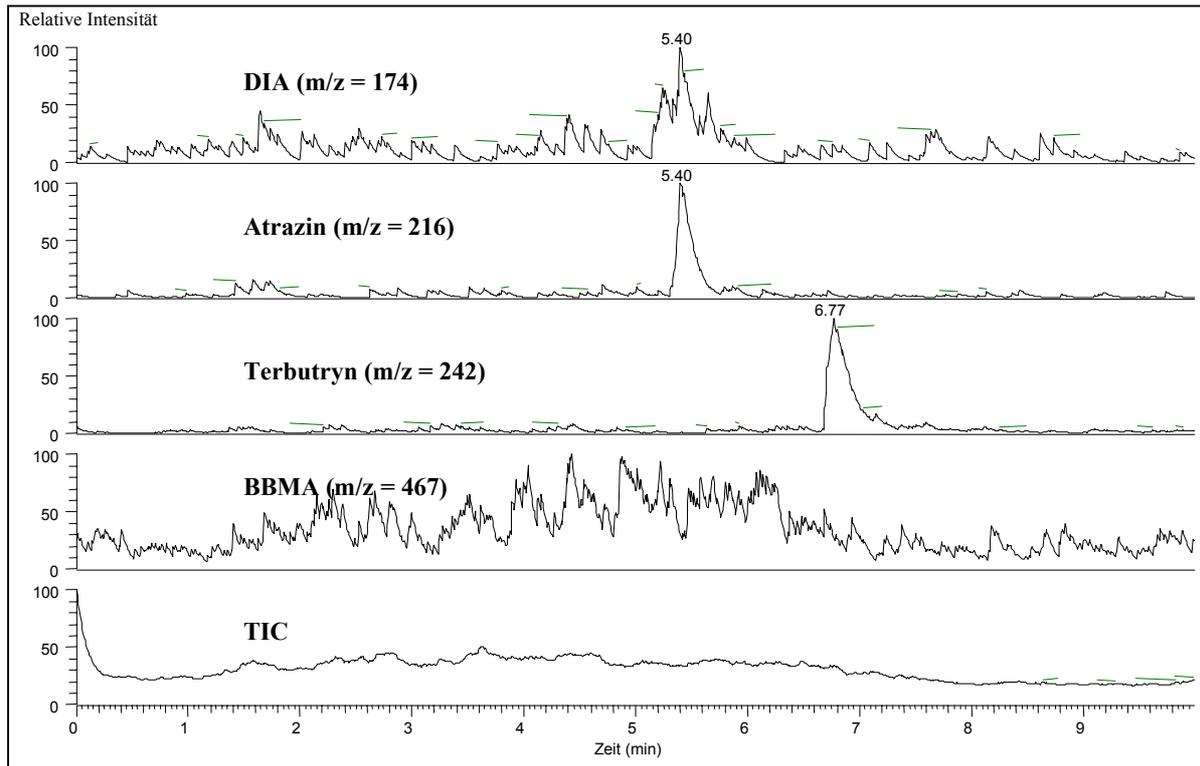
BBMA (Acrylat-butyl methacrylat-methacrylic Säure Copolymer Natrium-Salz) ist ein hochmolekulares Tensid (Molekül-Masse größer 40000) mit einer CMC von 0 [Ozaki et al., 1995, 1998].

Ozaki et al. verwendete BBMA u.a. in der partial filling-Technik zur Analyse von Naphthalen - Derivaten [Ozaki et al., 1998]. Maßgebend war hier die Tatsache, daß BBMA bei niedriger Konzentration Mizellen bildete. Das bedeutete, daß schon bei geringem Mizellarkonzentrationen eine Trennung möglich war. Das wiederum würde sich positiv auf Messungen in PF-MEKC-ESI-MS auswirken, da die Ionenquelle nicht mit hohen Tensidkonzentrationen „belastet“ würde.

Deshalb wurde in diesem Abschnitt die qualitative Analytik von ausgewählten Agrochemikalien in PF-MEKC-ESI-MS mit BBMA als pseudostationäre Phase untersucht.

Ausgehend von PF-MEKC-ESI-MS-Experimenten mit SDS wurden bei einem Kapillaren-Füllungsgrad von 40% und unter Verwendung eines 10 mM Natriumborat-Puffers (pH 9.2) drei Agrochemikalien DIA ( $m/z = 174$ ), Atrazin ( $m/z = 216$ ) und Terbutryn ( $m/z = 242$ ) mit BBMA als pseudostationäre Phase getrennt (Abb. 24).

Substanz 1 (DIA) zeigte keine deutliche Auflösung, während dagegen Atrazin und Terbutryn deutliche Peaks zeigten. Man erkannte in Spur 4 eine unregelmäßige Erhöhung der Basislinie herrührend von der BBMA-Front, die ins MS migrierte. Diese Ergebnisse zeigten, daß genauso wie im Falle des SDS, die partial filling-Methode mit BBMA optimiert werden müßte.



**Abb. 24:** Trennung von drei Agrochemikalien, namentlich DIA ( $m/z = 174$ ; 1. Spur), Atrazin ( $m/z = 216$ ; 2. Spur) und Terbutryn ( $m/z = 242$ ; 3. Spur) getrennt (Konzentration = 10 ppm; Konzentration BBMA : 5 ppm). Spur 4 gab den Verlauf der BBMA-Front an. Deren Hauptpeak war  $m/z = 467$ . 5. Spur : TIC

Ein Vorteil von BBMA ist die Bildung von Mizellen bei niedrigen Konzentrationen, so daß eine weniger ausgeprägte Kontamination des MS stattfindet. Ozaki et. al. konnte eine Verringerung der Signalintensität bei Erhöhung der BBMA - Konzentration zeigen [Ozaki et al., 1998 b].

PF-MEKC-ESI-MS mit BBMA zur Analytik von ausgewählten Agrochemikalien konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden. Unter der Vielzahl der möglichen Tenside wurde das Hauptaugenmerk auf BBMA gerichtet, da es von Ozaki et.al. (s.o.) schon charakterisiert worden war.

Eine andere Möglichkeit wäre die Verwendung von geladenen Cyclodextrinen (CD), wie sie schon Rudaz [Rudaz et al., 2000] zur Analytik von Tramadolmetaboliten beschrieben hatte. Hierbei mußte allerdings einbezogen werden, daß CD's als pseudostationäre Phase ein anderes Verhalten zeigten und somit die PF-Technik für diese Anwendung erst optimiert werden mußte.

#### 4.2.4 Erklärung der quantitativen PF-MEKC-ESI-MS-Daten anhand der Spraystabilität

Verglich man die quantitativen Daten (vgl. Abschnitt 4.2.2 f) untereinander, so stellte man in den ermittelten Nachweisgrenze gravierende Unterschiede fest (z.B.  $m/z = 174$  und  $216$  mit 2.7 bzw. 0.65 RSD%). Diese Tatsache ließ sich auf die Stabilität des Sprays zurückführen.

Im SIM-Modus konnte nicht der Total Ion current (TIC) bestimmt werden, der für eine exakte Interpretation notwendig war, dennoch ließ sich eine Aussage über die Ausbildung der Signale und somit der Spraystabilität machen. Schlechte Nachweisgrenzen bzw. Reproduzierbarkeiten ließen einen nicht stabilen, unregelmäßigen Spray vermuten. Da diese Messungen bei einem sheath gas Fluß von 5 arb-Einheiten durchgeführt wurden, hatte der Stickstofffluß eine entscheidende Auswirkung auf die Ausbildung des Taylor-Konus und somit einer optimalen Ionenbildung.

Zusammenfassend ließ sich sagen, daß die Anpassung der PF-MEKC für die CE-ESI-MS-Kopplung funktionierte; es konnten s-Triazin-Herbizide unterschiedlicher Hydrophobizität ohne Kontamination des MS durch SDS detektiert und quantifiziert werden. Da aber zu dem Zeitpunkt der Messungen (Oktober 2001) noch nicht alle die Spraystabilität beeinflussende Parameter bekannt waren, stellten die quantitativen Daten einen noch nicht fixen Wert dar, vielmehr sollten sie die Richtung angeben, was noch möglich nach kompletter Optimierung möglich wäre.

In den folgenden Kapiteln zur Optimierung der CE-ESI-MS-Kopplung wurden wichtige Parameter untersucht, die eine CE-ESI-MS-Trennung beeinflussten. Welchen Effekt hatten die einzelnen Parameter auf eine CE-ESI-MS-Trennung?

### 4.3 Optimierung der CE-ESI-MS-Kopplung-Voraussetzung für eine reproduzierbare Detektionssensitivität

#### 4.3.1 Zusammenfassung wichtiger CE-ESI-MS-Parameter

Das Ziel der Optimierung der CE-ESI-MS war das Herausfinden der Gewichtung und Zusammenhänge der einzelnen Parameter, die eine Trennung beeinflussen konnten. War eine Erhöhung der Sensitivität durch optimierte Parameter möglich?

Die Tabelle 18 faßt alle wichtigen Parameter zusammen, die im Rahmen der Optimierung des Systems (mit Original – bzw. modifiziertem ESI- Interface) untersucht worden sind:

Parameter	Effekt	Abschnitt
<b>A) Grundeinstellungen: Höhe CE zu MS, Maße</b>	Exakte Nivellierung möglich: keine Siphoning-Effekte	4.3.3, 4.3.4
<b>B) Sheath gas flow (Stickstoff)</b>	Saugeffekt; Selektivität	4.3.5 ff
<b>C) Sheath liquid</b>	Leitende Verbindung, optimale Sprayausbildung	4.3.6 ff
<b>D) Temperatur der heated capillary</b>	Signalintensität	4.3.7 ff
<b>E) Abstand ESI-needle zu heated capillary, Sprayspannung, CE-Kapillarenabstand (modifiziertes System)</b>	Abnahme/ Zunahme Empfindlichkeit	4.3.8 ff
<b>F) Kopplung zweier Kapillaren mit gleichem und unterschiedlichem Durchmesser</b>	Beschleunigung des EOF und Migrationszeiten der Substanzen: Venturi-Effekt	4.3.9 ff

**Tab.18:** Zusammenfassung wichtiger Parameter, die CE-ESI-MS-Trennungen beeinflussen

#### 4.3.2 Zusammenfassung Spraystabilität und Signalausgebung-Vergleich Original ESI-Interface und modifiziertes ESI-Interface

Der **Sheath gas** (Abschnitt 4.3.5 ff) übte einen Einfluß auf die Spraystabilität und somit Signalintensität aus: Im Gegensatz zum modifiziertem ESI-Interface ließen sich im Originalinterface nur anhand des TIC Aussagen über die Ausbildung des Sprays machen. Im modifiziertem ESI-Interface wurde unter visueller Kontrolle festgestellt, daß im Regelfall kein sheath gas notwendig war, um die Ausbildung des Taylor-Konus zu gewährleisten

(Positivmodus). Diese Kombination wäre der reine Elektrospray ohne pneumatische Unterstützung. Jedoch kann der Sheath gas bis ca. 30 arb angewendet werden.

Im Gegensatz zum Positivmodus mußte im Negativmodus ein Sheath gas von mindestens 20 arb angewandt werden, um einen stabilen TIC zu erhalten. Limitiert war die **Sprayspannung**, da weniger als – 4 kV zu einem sehr hohen Spray current (ca. 81  $\mu\text{A}$ ) und damit reduzierten Analytsignal führten. Im Regelfall lag der Spray current unter Verwendung eines 10 mM Ammoniumcarbonatpuffers, pH 10.3 bei ca. 35-40  $\mu\text{A}$ . Im Positivmodus lag ohne sheath gas der Spray current bei ca. 15-20  $\mu\text{A}$  unter Verwendung eines 10 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 6.8. Im Regelfall bei Anwendung von 5-5.4 ESI-kV reproduzierbare Analysenwerte erhalten. Die Messungen in Abschnitt 4.3.5.2 f wurden mit dem Originalinterface durchgeführt; wie oben erwähnt war keine visuelle Kontrolle möglich. Die Messungen in Abschnitt 4.3.8 f wurden mit dem modifizierten ESI-Interface durchgeführt; eine direkte visuelle Kontrolle war möglich, was sich auch u.a. auf die Durchführung der Optimierung auswirkte.

Der **Abstand ESI-needle zu heated capillary** war ein wesentlicher Parameter, der bei jeder CE-ESI-MS-Trennung berücksichtigt werden mußte (modifiziertes Interface). In Kap. 4.3.8 f kristallisierte sich ein optimaler Abstand von 5 mm bei 50  $\mu\text{m}$  I.D. (360  $\mu\text{m}$  O.D.) - Kapillaren heraus (CE-ESI-nozzle). Bei Verwendung von 50  $\mu\text{m}$  I.D. (190  $\mu\text{m}$  O.D.) - Kapillaren war ein Abstand von 3.5 bzw. 5.6 mm für die Signalintensität maximal.

Der **CE-Kapillarenabstand** war für die Ausbildung der Analytsignale am besten, wenn die CE-Kapillare bündig mit der ESI-needle abschloß.

Die **Sheath liquid** mußte für die einzusetzenden Analyten optimiert werden. Jedoch wurde festgestellt, daß das Gemisch Methanol/Wasser/Ameisensäure:50/49/1 (=Standardgemisch) für wässrige Messungen im Positivmodus ausreichte, um „gute“ Signalintensitäten zu erhalten. Zur Messungen von Anionen im Negativmodus sollte ein stark alkalisches Gemisch eingesetzt werden - Methanol/Wasser/Ammoniak:50/45/5, das kontinuierlich aus dem Sheath liquid Kanal austreten konnte. Die **Flußrate** der Sheath liquid wurde immer so gering wie möglich gehalten. In den durchgeführten Experimenten eignete sich ein Fluß von 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Geringere Flüsse konnten nicht reproduzierbar eingestellt werden. Im Nichtwässrigen wurde

beobachtet, daß der CE-current zusammenbrach, wenn keine sheath liquid floß. In diesem Fall wurde auf 2.5 µl/min zurückgegriffen.

Die **Temperatur der heated capillary** war in Abhängigkeit von der thermischen Stabilität der Analyten zu optimieren. Bei thermisch labilen Substanzen (Sulfonylharnstoffe, Addukte) lag das Optimum bei 100 °C; geringere Werte wurden nicht eingestellt, um bei wässrigen Lösungen kein Eindringen von Wasser in die heated capillary zu vermeiden. Für weniger thermisch labile Analyten (s-Triazine) lag das Optimum bei ca. 150-160 °C. Mehr als 200 °C wurden nicht eingestellt, da im jeden Fall thermischer Abbau stattfand.

Bei der Verwendung von **Venturi-Kapillaren** eignete sich die Kombination 50-40-360-360 bzw. 75-40-360-360 am besten bei 5.2 ESI-KV und ca. 4.5 mm Abstand ESI-needle zu heated capillary. Bei der anderen Kopplungen (75-50-360-360) konnten zwar Signale erhalten werden, die sich aber nicht deutlich genug von den Kapillarenkopplungen gleichen Durchmessers (50-50-360-360) unterschieden. Bei der Kopplung 50-40-360-360 mußte auf Spülprozesse zwischen den Messungen bzw. zu Beginn und am Ende einer Messreihe geachtet werden, da sonst massive Verstopfungen auftraten.

Für den praktischen Einsatz dieser Kopplungen konnten zwar für die Kopplung 50-40-360-360 gegenüber den anderen Kopplungen erhöhte Peakintensitäten und Signal-Rausch-Verhältnisse erhalten, aber aufgrund der leichten Verstopfbarkeit dieser Kapillaren sind diese nicht zu empfehlen.

### **4.3.3 Grundeinstellungen und Maße (Original Interface Thermo Finnigan)**

#### **4.3.3.1 Höhe CE zu MS**

Bevor verschiedene CE-ESI-MS Parameter durchgetestet werden konnten, die eine Trennung beeinflussten, mußte die Höhe CE relativ zum MS eingestellt werden. Die CE befand sich auf einen rollbaren Hubwagen, mit der Möglichkeit der vertikalen Verstellung. Das MS stand fix auf einem stabilen Tisch. Da in der CE-ESI-MS-Kopplung die CE-Kapillare vom Inlet-Puffervial nicht in ein zweites Pufferreservoir eintauchte, sondern in den Elektrospray-Kopf geleitet wurde, war die relative Höhe von Puffervial zu Ende der Kapillare wesentlich. Befände sich die Kapillare aufsteigend, d.h. das Ende wäre deutlich über dem Anfang, so würden Rückstaueffekte innerhalb der Kapillare auftreten, im entgegengesetzten Fall würde

mehr Flüssigkeit herausfließen. Beide Einstellungen führten zu nicht reproduzierbaren Messergebnissen. Es wurde die CE auf dem Hubwagen so nivelliert, daß das Inlet-Puffervial auf dem Niveau des Kapillarenende lag.

#### **4.3.3.2 Weitere Grundeinstellungen**

Weitere Vorbereitungen mußten getroffen werden, die in folgender Tabelle zusammengefaßt sind.

##### Im ESI-Kopf:

Der Spray-Kopf wurde auf Position 2 eingestellt. Der Abstand zwischen ESI-needle und ESI-nozzle betrug 1,1 mm

##### Im Spray Shield:

Die heated capillary mußte so in der Mitte des Spray Shieldes fixiert werden, daß diese 10 mm hervorstand.

#### **4.3.4 Grundeinstellungen und Maße mit modifiziertem Interface**

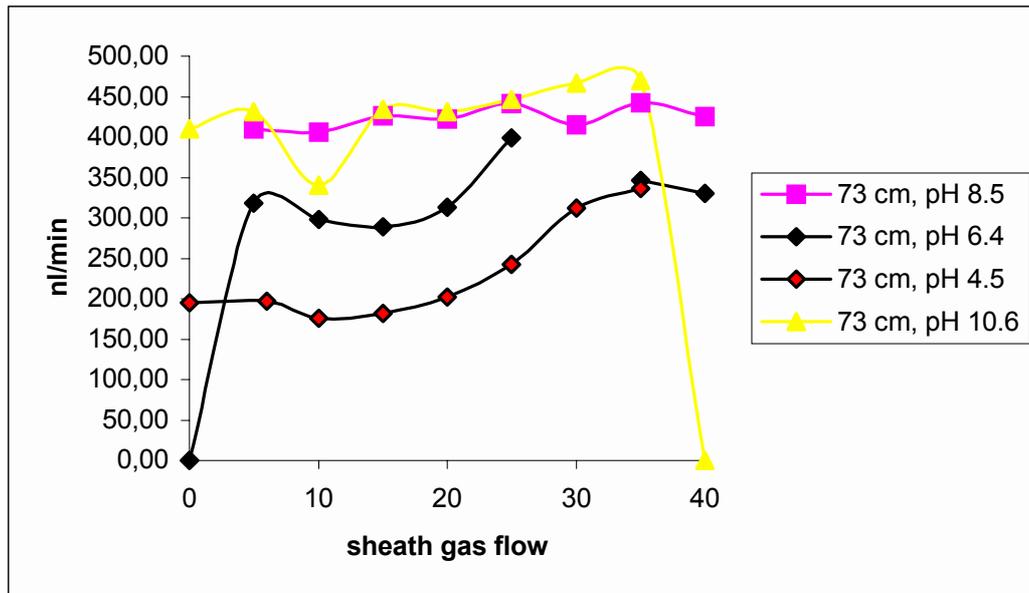
Die Grundeinstellungen (Höhe CE zu MS, Abstand ESI-needle von ESI-nozzle) konnten auf das modifizierte ESI-Interface übertragen werden (siehe Abschnitt 6.2 ff).

#### **4.3.5 Einfluß von „sheath gas“**

##### **4.3.5.1 Theoretischer Hintergrund und Möglichkeit der Anwendung – Original ESI-Interface**

Der sheath gas flow (Stickstoff) diente zur Stabilisierung des Elektrosprays, der auf die heated capillary gerichtet war [Handbuch LCQ duo]. Durch die Einwirkung von sheath gas kam es zu „Saugeffekten“ auf die Flüssigkeit innerhalb der CE-Kapillare, wonach der EOF und die damit verbundene Flüssigkeitsmenge beeinflusst werden konnten.

Bei vier verschiedenen pH-Werten (4.5, 6.4, 8.5, 10.6), einer konstanten Puffermolarität von 10 mM und einer konstanten Säulenlänge von 73 cm wurde der Saugeffekt mit s-Triazin-Herbiziden als Modellsubstanzen untersucht (von 0 bis 40 arb; 20 arb entsprechen ca. 0.3 l/min). Abbildung 25 faßt den Zusammenhang Massenströme (nl/min) und sheath gas zusammen.



**Abb. 25:** Massenströme (nl/min) abhängig vom Einfluß des sheath gas; CE-Bedingungen: 10 sec Injektion, 30 kV, Puffermolarität: 10 mM; pH 4.5 und 6.8 Ammoniumacetat, pH 8.5 und 10.6 Natriumborat, MS-Bedingungen: 5 ESI-kV, 6 arb, 150 °C (heated capillary), sheath liquid: 2.5 µl/min (Methanol/Wasser/Ameisensäure: 50/49/1)

Bei einem pH-Wert von 4.5 war der Einfluß des sheath gas am größten relativ zu den anderen untersuchten pH-Werten. Von anfänglich ca. 200 nl/min bei 0 arb. wurde bei 40 arb ein Wert von über 300 nl/min erreicht. Vergleich man dies mit pH 10.6, so waren keine wesentlichen Veränderungen innerhalb der Reihe von 0 zu 40 arb festzustellen; es erreichten ca. 400 nl/min das Kapillarenende.

Der pH 6.4 rangierte zwischen pH 4.5 und 10.6 mit einem Wert von ca. 300 nl, aufsteigend auf ca. 350 nl. pH 8.5 zeigte ähnliche Werte wie pH 10.6. Insgesamt bedeutete das, daß mit zunehmendem pH-Wert der Einfluß des sheath gas relativ gesehen abnahm und ab ca. pH 8.5 stagnierte.

Praktisch könnte der sheath gas Effekt angewendet werden, um Trennungen abhängig vom

pH-Wert zu beschleunigen und Selektivitäten bei Substanzen unterschiedlicher Mobilität hervorzurufen. Diese Möglichkeit der Anwendung des sheath gas flows wurde im nächsten Kapitel untersucht, ebenso der Zusammenhang sheath gas flow und Spraystabilität.

#### 4.3.5.2 Einfluß sheath gas flow auf Trennungen in wässrigen Systemen

Eine Modelltrennung wurde mit einem Substanzgemisch unterschiedlicher effektiver elektrophoretischer Mobilität (Benzoessäure:  $-0.015$ , Phthalsäure:  $-0.025$ , 1,3,5-Benzentricarbonsäure:  $-0.035$  und 1,3,4,5-Benzentetracarbonsäure:  $-0.045$   $\text{cm}^2/\text{Vmin}$ ) bei 3 verschiedenen pH-Werten durchgeführt (pH 4.5, 6.8 und 10.0). Die ESI-MS-Detektion der Quasimolekülonen  $[\text{M}-\text{H}]^-$  erfolgte im Negativ-Ionen-Modus.

Zunächst sollte der Einfluß des sheath gas flow nach 20 cm (UV-Detektion) mit charakteristischen Elektropherogrammen erklärt werden (Abschnitt 4.3.5.2.1). Anschließend wurde die „MS-Seite“ näher betrachtet unter Einbezug des Zusammenhangs sheath gas flow und der Spraystabilität.

##### 4.3.5.2.1 Interpretationsansätze des sheath gas Einflusses nach 20 cm (UV-Detektion)

Die Elektropherogramme bei pH 4.5 zeigten, daß Benzoessäure und Phthalsäure als scharfe Peaks detektiert wurden, die Peaks der höher substituierten organischen Carbonsäuren 1,2,4-Benzentri- und 1,2,4,5-Benzentetracarbonsäure verloren an Schärfe, vor allem die zuletzt genannte Substanz „schmierte“ über einen weiten Bereich im Elektropherogramm (ohne Abb.). Das war Ursache der vom pH-Wert abhängigen Ladung und der Molekülgröße. Der  $\text{p}K_{\text{a}1}$  nahm innerhalb der Reihe Benzoessäure zu 1,2,4,5-Benzentetracarbonsäure ab; somit nahm die Säurestärke (Brönstedtsäurestärke) zu. Tabelle 19 gibt einen Überblick über alle Säurekonstanten der vier Stoffe.

Substanz	Molmasse [g/mol]	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>	pKa <sub>3</sub>	pKa <sub>4</sub>
<b>Benzoessäure</b>	122	4.2	-	-	-
<b>Phthalsäure</b>	166	2.95	5.41	-	-
<b>1,2,4-Benzentricarbonsäure</b>	210	2.81	4.16	4.76	-
<b>1,2,4,5-Benzen-tetracarbonsäure</b>	254	1.86	3.03	4.50	5.67

**Tab. 19:** Molmassen und Säurekonstanten der untersuchten Substanzen (Benzoessäure, Phthalsäure, 1,2,4-Benzentricarbonsäure, 1,2,4,5-Benzentetracarbonsäure), berechnet mit PALLAS 3.11 für Windows.

Ausgehend von den pKa- und pH-Werten (4.5, 6.8, 10.0) war der Ionisierungsgrad der vier organischen Säuren bei pH 4.5 schwach ausgeprägt, wobei Benzoessäure wesentlich schwächer ionisiert war als 1,2,4,5-Benzentetracarbonsäure. Die zuletzt genannte Carbonsäure war bei pH 4.5 etwa so stark ionisiert wie Benzoessäure bei nächsthöherem untersuchten pH. Bei pH 6.8 nahm der Ionisierungsgrad der Substanzen zu und bei pH 10.0 lagen alle Moleküle vollständig deprotoniert vor.

Der Einfluß des EOF war bei pH 4.5 sehr gering, so daß die unterschiedlich stark ionisierten Substanzen auch unterschiedliche Tendenz aufwiesen, zur Kathode zu wandern (also entgegengesetzte Richtung). Das war bei 1,2,4,5-Benzentetracarbonsäure am stärksten und bei Benzoessäure am schwächsten ausgeprägt. Hinzukam die ansteigende Masse zur vierfach substituierten Carbonsäure. Das bedeutete, daß das Molekül mit der größten Molekülmasse und dem höchsten (negativen) Ionisierungsgrad, die geringste Tendenz zeigte, zur Anode zu wandern.

Insgesamt gesehen fand aufgrund des EOF ein Fluß in Richtung der negativen Elektrode statt, aber nur sehr langsam. Aufgrund der Tendenz der vierfach substituierten Carbonsäure zur Anode zu wandern, wurde sie nur sehr gering vom EOF beeinflusst. Das bewirkte ein „Schmierer“ des Substanzpeaks.

Bei Erhöhung des sheath gas flows wurde eine deutliche Peakverschmälerung und eine Reduzierung der Migrationzeiten beobachtet (Abb. 26), vor allem bei der dreifach und vierfach substituierten Carbonsäure. Der Einfluß des sheath gas flows auf Benzoessäure und

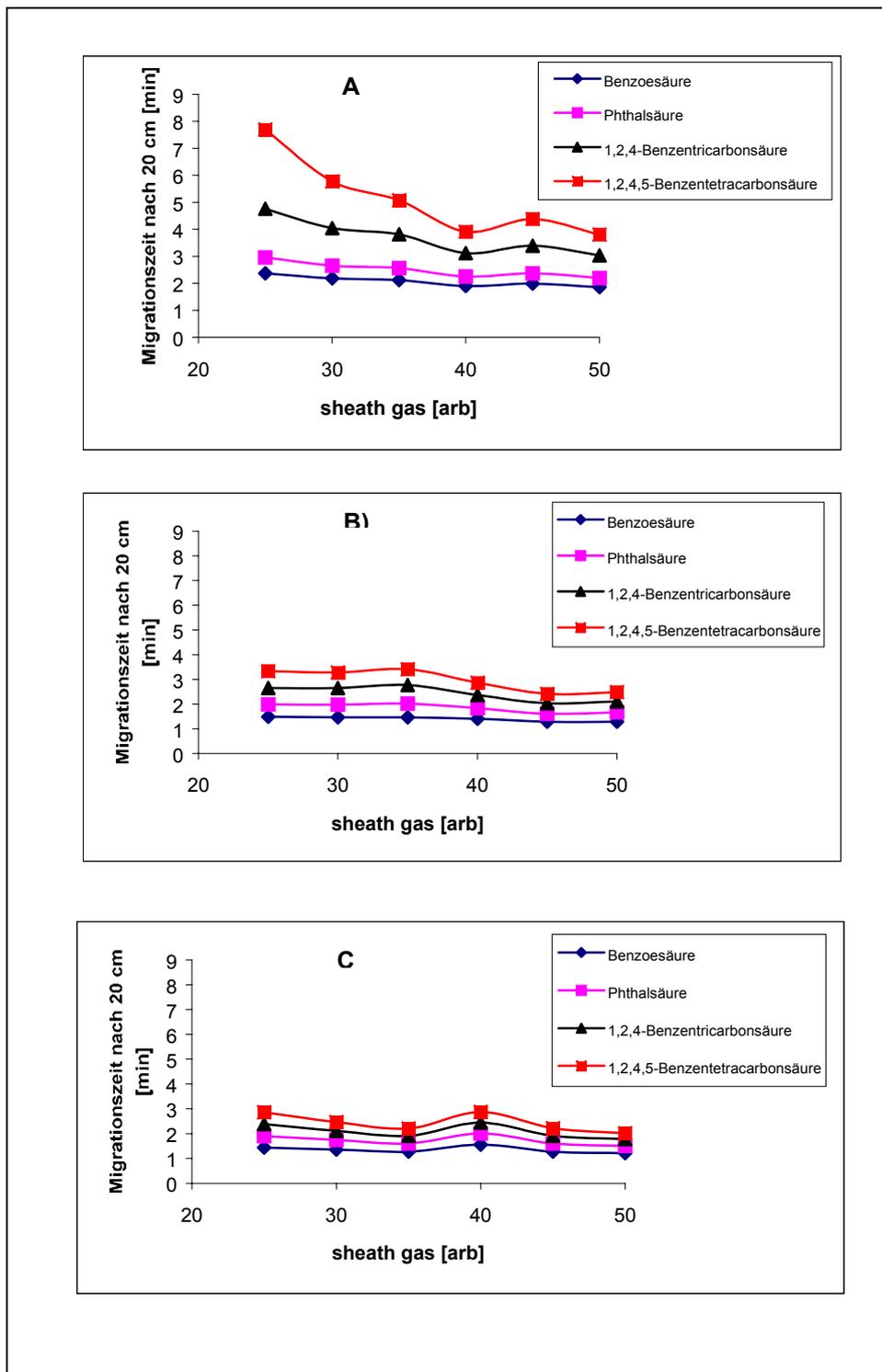
Phthalsäure war weniger ausgeprägt. Sie wanderten von Anfang an schneller im System und wurden als scharfe Peaks detektiert.

Mit zunehmendem pH-Wert nahm der Deprotonierungsgrad der Substanzen und die Geschwindigkeit des EOF zu, was sich deutlich auf das Migrationsverhalten auswirkte. Bei „hohem“ EOF (pH 10.0) und einen sheath gas Effekt von 25 arb, wurden alle 4 Substanzen als scharfe Peaks detektiert.

Letztendlich nahm bei ansteigendem pH-Wert (Abb. 26) der Einfluß der Einfluß des sheath gas flows für die Substanzen ab.

Somit hatte bei geringstem pH der sheath gas flow den größten Einfluß auf die Substanz mit der kleinsten elektrophoretischen Mobilität (1,2,4,5-Benzentetracarbonsäure); dieser Einfluß schwächte sich mit zunehmendem pH-Wert ab. Sowohl bei pH 4.5 als auch pH 10.0 war der Einfluß des sheath gas flows auf die Substanz mit der höchsten elektrophoretischen Mobilität (Benzoessäure) am geringsten.

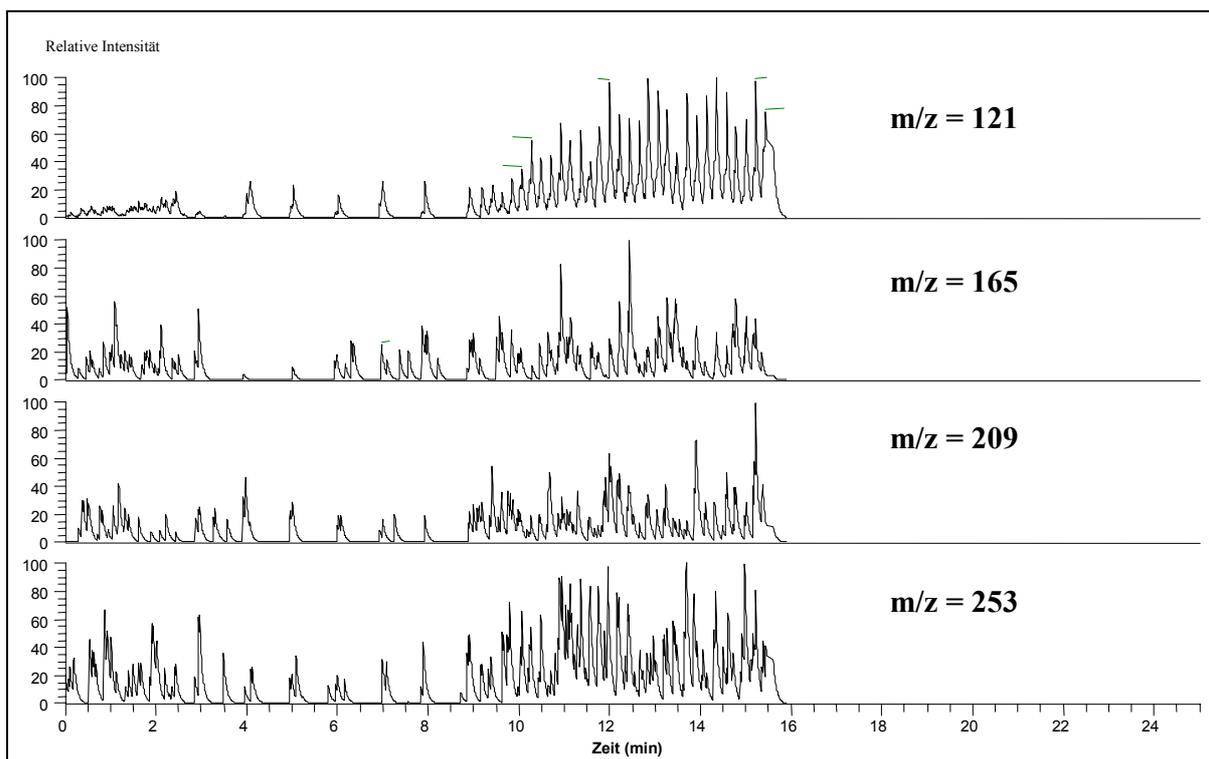
Was jedoch nicht aus den Überlegungen hervorgegangen war, welche dieser Substanzen unter den experimentellen Bedingungen im Massenspektrometer nachweisbar war. Übt die Erhöhung des Sheath gas flow einen Effekt auf die Spraystabilität im Elektrospray aus? Das wurde Gegenstand des nächsten Kapitels.



**Abb. 26:** Einfluß des Sheath gas flows auf Trennungen von vier Substanzen (Benzoessäure, Phthalsäure, 1,2,4-Benzentricarbonsäure, 1,2,4,5-Benzentetracarbonsäure) bei drei verschiedenen pH-Werten: A) pH 4.5, B) pH 6.8 und C) pH 10.0, Detektion nach 20 cm (UV), zunächst ohne Berücksichtigung der ESI-MS-Detektion

#### 4.3.5.2 Einfluß des sheath gas flows anhand der Meßergebnisse nach 73 cm (ESI-MS-Detektion)

Bei pH 4.5 konnten mittels ESI-MS-Detektion Benzoesäure ( $m/z = 121$ ) und Phthalsäure ( $m/z = 165$ ) von 25 bis 50 arb sheath gas flow nachgewiesen werden, ebenso 1,2,4-Benzentricarbonsäure ( $m/z = 209$ ). Wie jedoch zuvor vermutet ließ sich 1,2,4,5-Benzentetracarbonsäure ( $m/z = 253$ ) bei 25 arb nicht mehr erkennen, da schon in der UV-Detektion nach 20 cm der Peak „verschmiert“ war und somit im ESI-MS die Substanzen im Hintergrund verschwanden (Abb. 27). Mit einem sheath gas Fluß von 30 arb konnte diese im ESI-MS erkannt werden, wenngleich die Peakschärfe noch unbefriedigend war. Wie bei 50 arb ersichtlich, war der Hintergrund sehr unregelmäßig, was auch zu unscharfen Analytsignalen führte (Abb. 29).



**Abb. 27:** Instabiles Hintergrundsignal durch Anwendung eines zu hohen sheath gas flows (50 arb) bei pH 4.5, Erklärung der Massenspuren ( $m/z$ ): siehe Text.

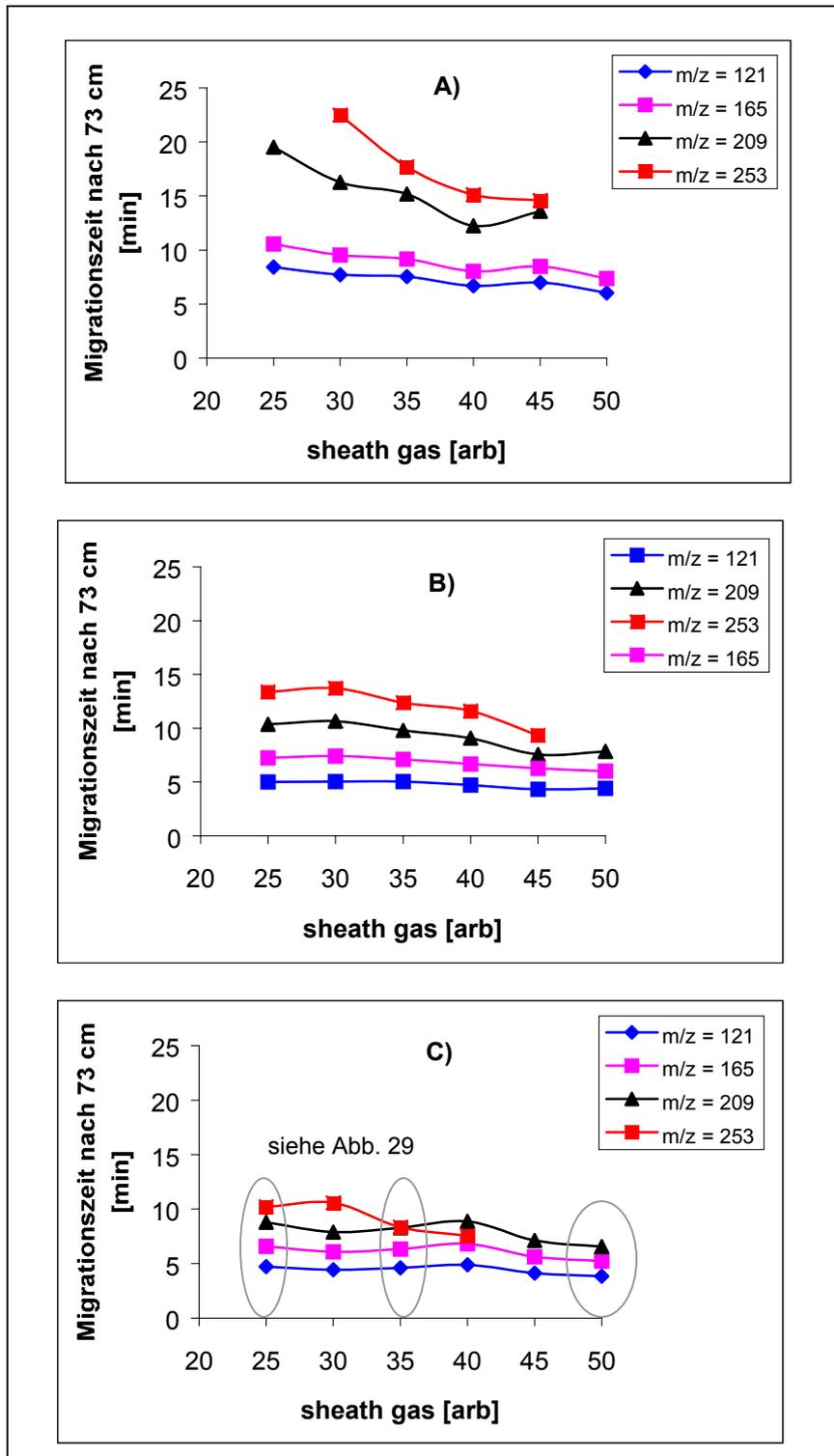
---

Bei pH 10.0 ließen sich ab 25 arb Peaks detektieren, die bis auf 1,2,4,5-Benzentetracarbonsäure der gewohnten Peakform entsprachen. Mit zunehmenden sheath gas flow (ab 40 arb) jedoch, nahm die Stabilität des Sprays ab, was in einen Verlust des Analytsignals resultierte (Abb. 28, 29).

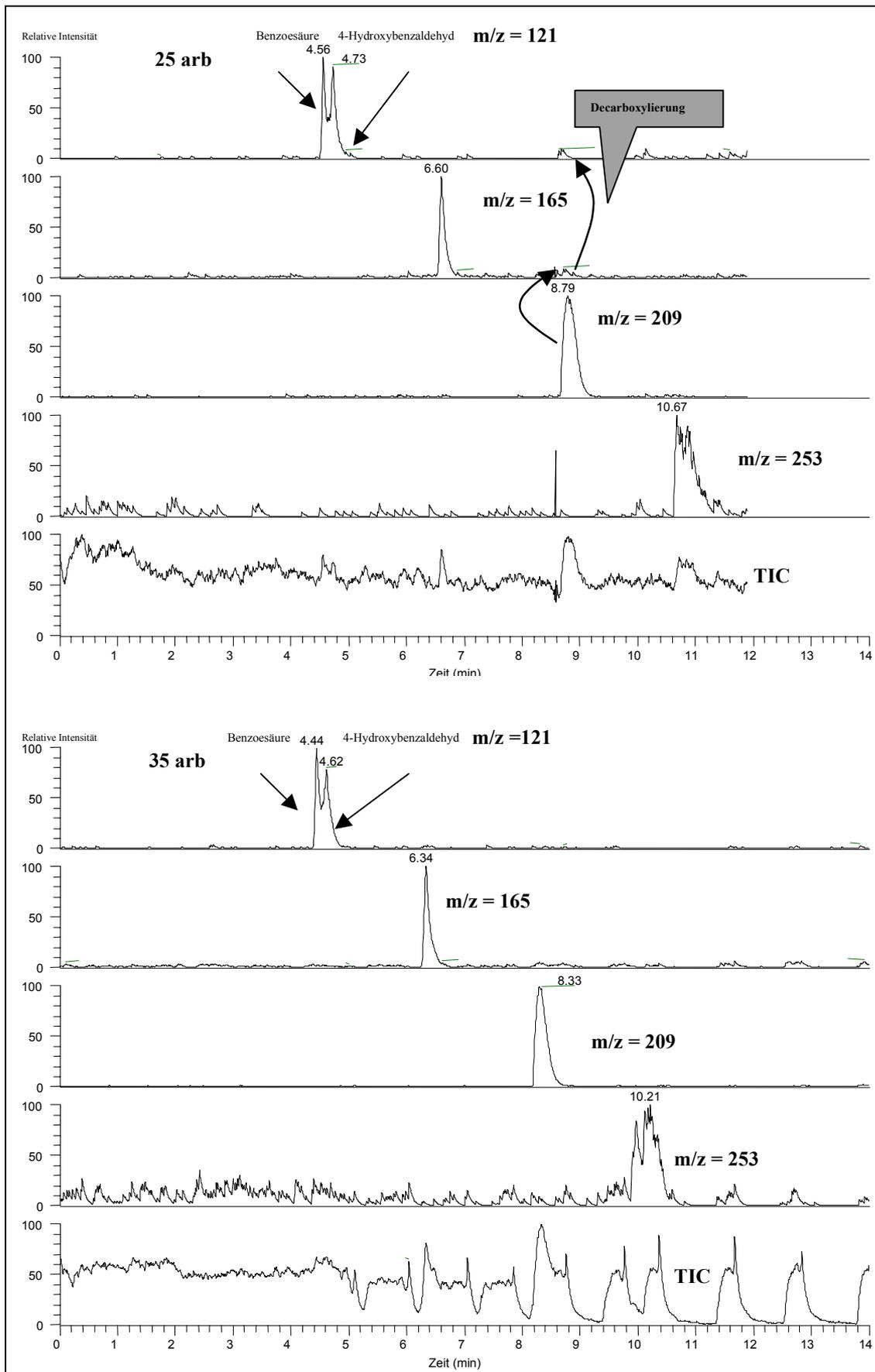
Wie aus Abb. 29 ersichtlich, wurde mit zunehmendem sheath gas Fluß bei pH 10 der Spray instabiler (vgl. auch TIC-Spur), was einen direkten Einfluß auf die Peakintensität hatte.

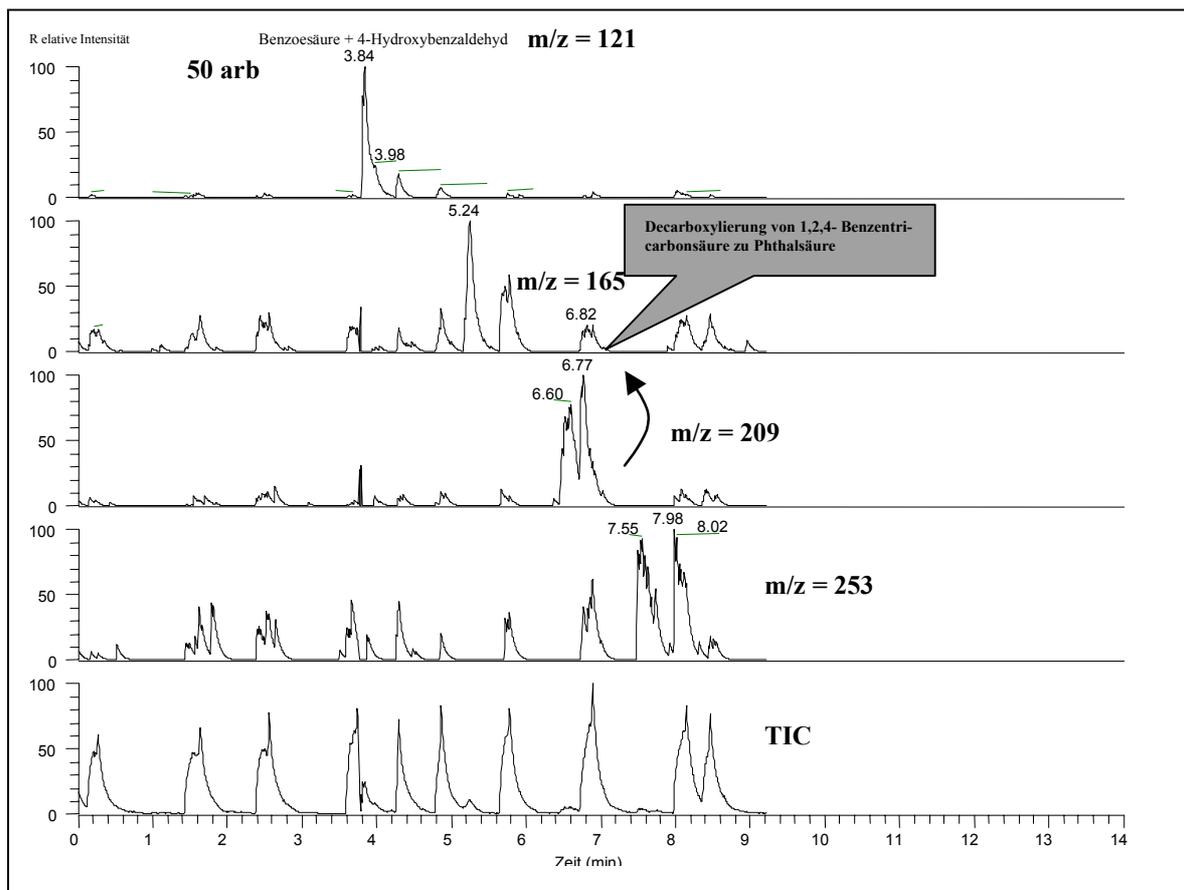
Um gute Peakschärfen zu erhalten, war ein hoher pH (10.0) unter Anwendung von nicht mehr als 30 arb an sheath gas (inhomogener Spray) zu empfehlen, da aufgrund des höheren EOF mehr Flüssigkeitsmenge aus der CE-Kapillare gefördert wurde. In den Experimenten wurde ein sheath liquid Fluß von 5 µl/min verwendet.

All diese Messungen wurden mit dem Original-ESI-Interface von Thermo Finnigan im Negativ-Ionen-Modus durchgeführt. Eine direkte Kontrolle des Sprayverhaltens war unter diesen Bedingungen (noch) nicht möglich.



**Abb. 28:** Darstellung Einfluß des sheath gas Flusses auf Trennung von vier verschiedenen organischen Carbonsäuren ; A): pH 4.5, B): pH 6.8 und C) pH 10.0, Detektion nach 73 cm (ESI-MS-Detektion), Erklärung der m/z = siehe Text.





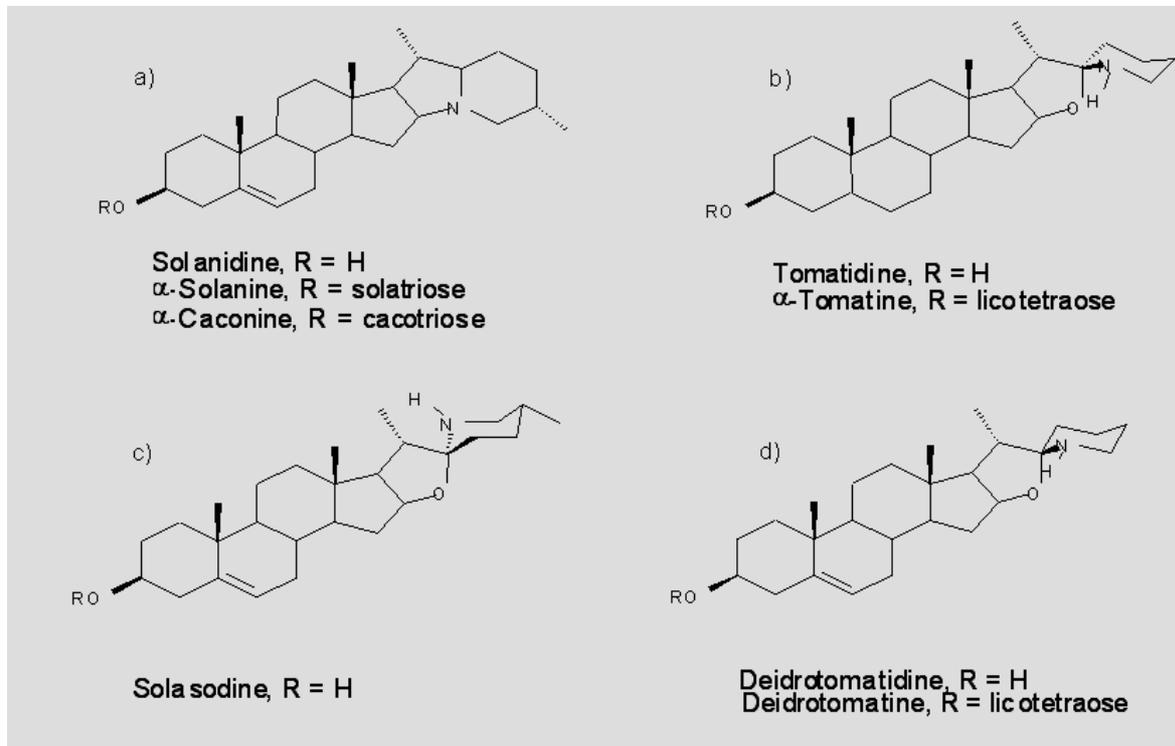
**Abb. 29:** Einfluß von sheath gas (25, 35, 50 arb) exemplarisch auf Trennungen von organischen Carbonsäuren bei pH 10.0, Erklärung der Analyten: siehe S. 91, 4-Hydroxybenzaldehyd: diente bei pH 4.5 und 6.8 als EOF-Marker, war bei pH 10 jedoch negativ geladen und migrierte deshalb nicht mit derselben Geschwindigkeit des EOF.

#### 4.3.5.3 Einfluß auf Trennungen in nichtwässrigen Systemen

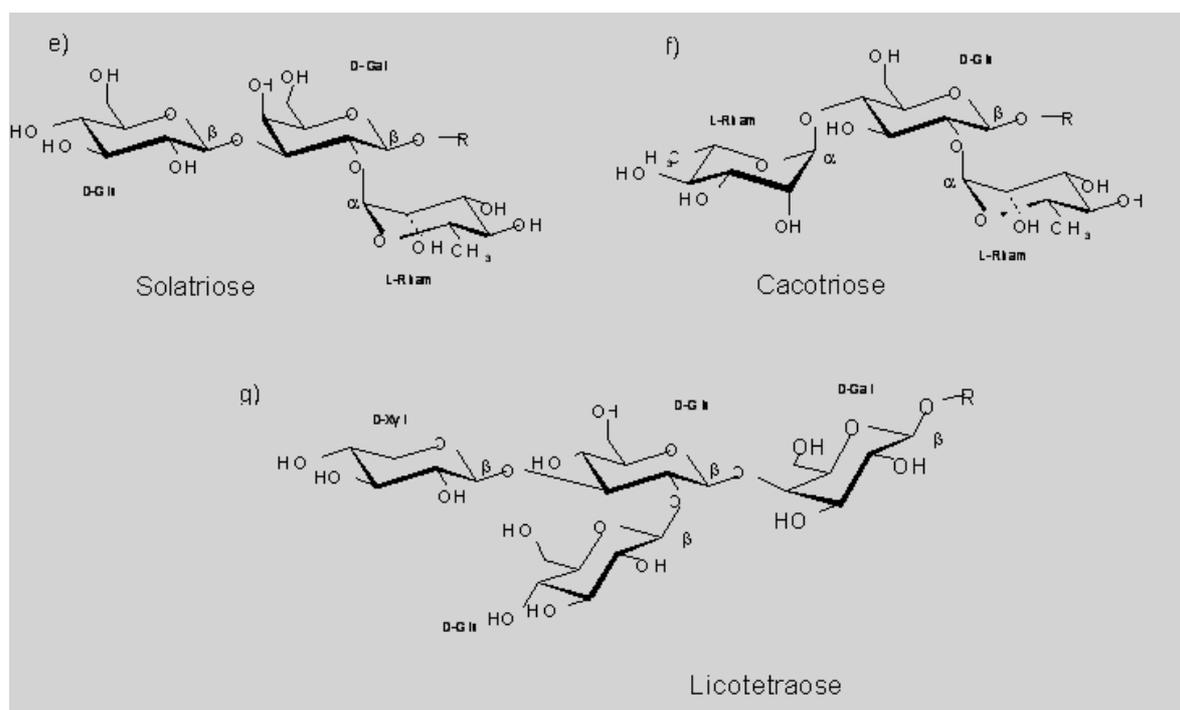
Die nichtwässrige (wasserfreie) CE-ESI-MS stütze sich auf die Verwendung hochflüchtiger Lösungsmittelkomponenten, die vollständig in die Gasphase überführt werden konnten. Wie im wässrigen Medium war auch in der wasserfreien Technik die Anwendung des sheath gas flows möglich. Welchen Einfluß hatte der sheath gas im Nichtwässrigen?

Der Sheath gas Einfluß auf die Trennung von fünf Glykoalkaloiden, namentlich Solanidin, Tomatidin, Chaconin, Solanin und Tomatin (Strukturformeln: Abb. 30, Massenspektrum Abb. 31) wurde unter Verwendung eines wasserfreien Ammoniumacetat-Puffers mit einer wechselnden Zusammensetzung an Methanol und Acetonitril untersucht. Aufgrund der

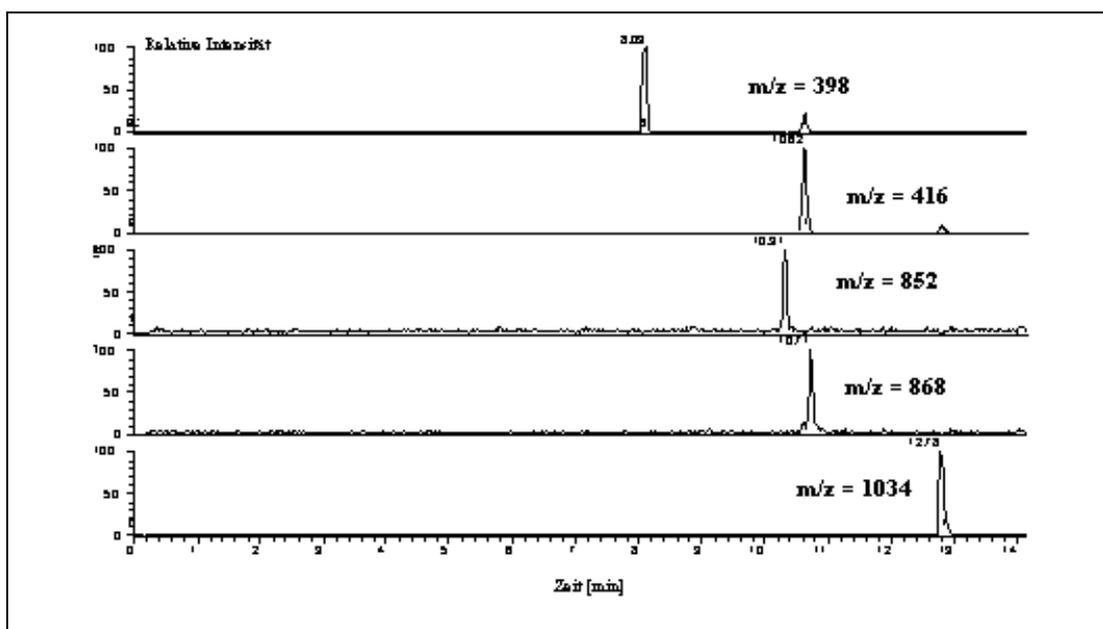
dadurch unterschiedlich erzeugten Viskosität kam es zu einem unterschiedlichen EOF-Verhalten (Tab. 20).



**Abb. 30:** Strukturformeln der untersuchten Glykoalkaloide (Aglykone). Abbildung aus [Bianco et al., 2001]



**Abb. 30 (Fortsetzung):** Strukturformeln der zugehörigen Zuckerreste. Abbildung aus [Bianco et al., 2001]



**Abb. 31:** Trennung von fünf Glykoalkaloiden in NACE; 1. Spur: Solanidin ( $m/z = 398$ ), 2. Spur: Tomatidin ( $m/z = 416$ ), 3. Spur: Chaconin ( $m/z = 852$ ), 4. Spur: Solanin ( $m/z = 868$ ), 5. Spur ( $m/z = 1034$ ): Tomatin; CE-Bedingungen: 50 mM Ammoniumacetat, mit 90:10 Acetonitril/ Methanol,  $pH^*$  4.75, 5 sec. Injektion, 30 kV; ESI-MS-Bedingungen: 4.5 ESI-KV, 0 arb, heated capillary: 180 °C, sheath liquid: Methanol/Wasser (1:1) mit 1 % Essigsäure @ 2.5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Diese Trennung entstand im Sommer 2001 in Zusammenarbeit mit Giuliana Bianco, Universita degli Studi della Basilicata, Dipartimento di Chimica, Potenza, Italien, Abbildung verändert nach [Bianco et al., 2001].

Der EOF-Peak konnte nach 20 cm aufgrund des unterschiedlichen Absorptionsverhalten Methanol/Acetonitril gegenüber der restlichen Pufferlösung deutlich erkannt werden.

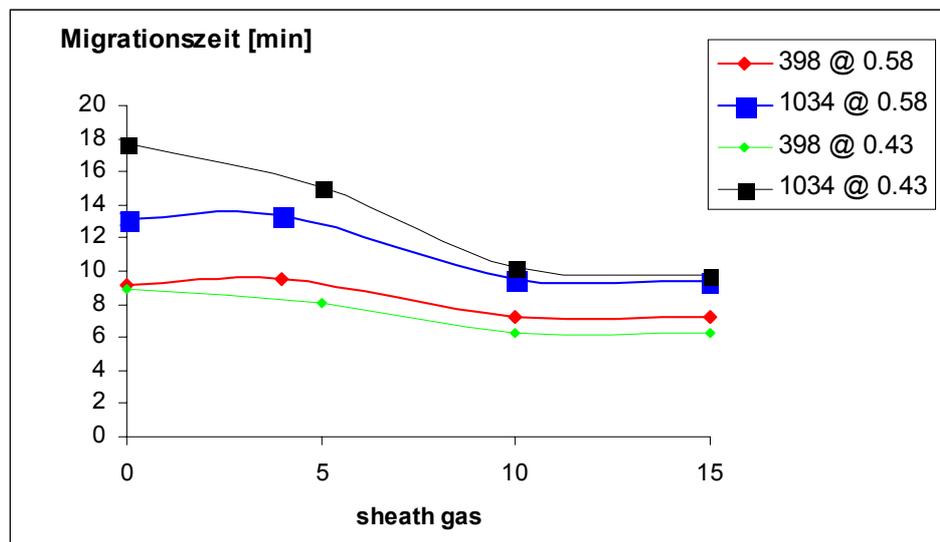
Sheath gas	Viskosität [mPas]	$pH^*$	EOF [nach 20 cm , in min]	EOF [cm/min]	Volumen* [nl/min]
0	0.43	4.4	6.77	0.34	26.6
0	0.54	5.1	5.70	0.28	22.4
0	0.58	5.3	4.44	0.22	17.4

**Tab. 20:** Zusammenhang  $pH^*$ , Viskosität, EOF (gemessen nach 20 cm) und austretende Flüssigkeitsmenge (berechnet auf Gesamtlänge der Kapillare = 80 cm). Die Viskosität basierte auf den Viskositäten der Einzellösungen: Methanol: 0.6 mPas, Acetonitril: 0.37 mPas. D.h. mit zunehmendem Acetonitrilgehalt wurde Gesamtviskosität kleiner. \*) Volumen aus EOF nach 20 cm, berechnet auf gesamte Kapillarlänge von 80 cm, 50  $\mu\text{m}$  I.D., Gesamtvolumen nach Beckman Expert: 1571 nl

Wie aus Tabelle 20 ersichtlich, nahm mit steigender Viskosität und  $pH^*$  der Gesamtpufferlösung die Geschwindigkeit des EOF ab und somit auch die Flüssigkeitsmenge (nl/min), die aus der CE-Kapillare ins MS eintrat.

Für Solanidin ( $m/z = 398$ ) und Tomatin ( $m/z = 1034$ ) wurden Sheath gas Experimente bis 15 arb bei zwei verschiedenen Viskositäten (0.43 und 0.58 mPAs) durchgeführt. Nur diese zwei Glykoalkaloide wurden untersucht, da diese im Elektropherogramm als erster bzw. letzter Peak detektiert wurden und somit den Bereich der Trennung angaben.

Der sheath gas Einfluß war für Tomatin am größten (von ca. 18 min bei 0 arb auf ca. 10 min bei 15 arb und 0.43 mPAs), während dagegen Solanidin von ca. 10 min auf ca. 7.5 min beschleunigt wurde. Bei 0.58 mPAs war bei beiden Substanzen der Effekt abgeschwächt (Abb. 32). Genauere Aussagen konnten zu diesem Zeitpunkt nicht gemacht werden, da die Messungen nur die Tendenz des Sheath gas Einflusses wiedergaben.



**Abb. 32:** Tendentieller Einfluß des Sheath gas Flusses (0-15 arb) auf Solanidin ( $m/z = 398$ ) und Tomatin ( $m/z = 1034$ ) bei einer Viskosität von 0.43 und 0.58 mPas

In NACE-ESI-MS konnten nicht mehr als 15 arb eingestellt werden, da der Spray sofort abriß und somit kein Signal detektiert werden konnte.

### **4.3.6 Einfluß sheath liquid**

#### **4.3.6.1 Theoretischer Hintergrund**

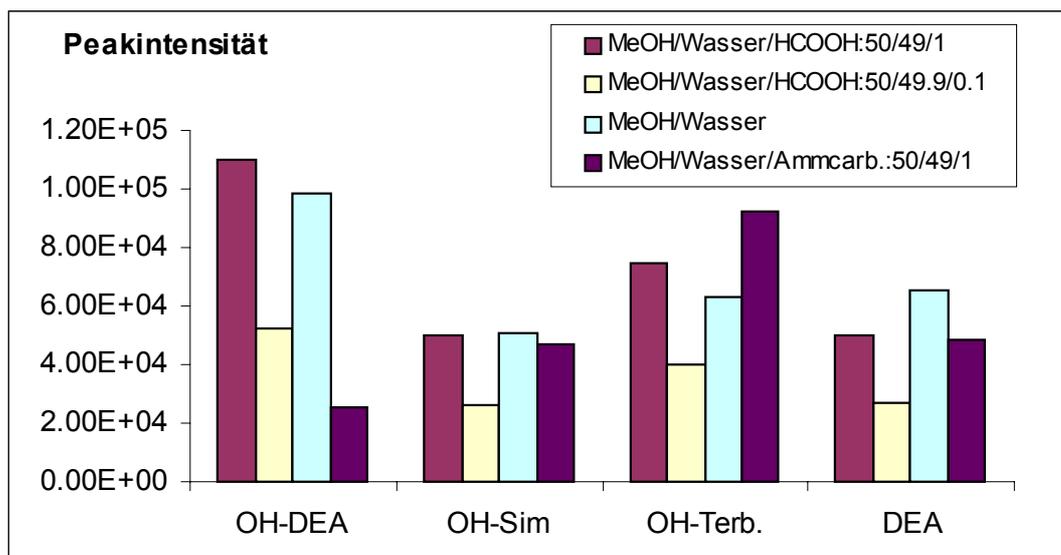
Die sheath liquid diente zur Stabilisierung des Elektrosprays [Kirby et al., 1996]; sie trat über die Spritzenpumpe in die ESI-nozzle coaxial zur ESI-Nadel aus [Handbuch LCQ duo]. Abhängig von dem Volumen der HPLC-Spritze (üblicherweise 100, 250, 500 µl) konnten über die LCQ duo-Software 1% oder 5 % pro min gefördert werden. Das entsprach 1µl /min bzw. 5µl/min im Falle einer 100 µl Spritze. Weiterhin unterstützte die Sheath liquid den elektrischen Kontakt mit dem Outlet der Trennkapillare [Kirby et al., 1996].

Wie schon in Abschnitt 3.3.4 kurz erläutert, führte eine zu „große“ Sheath liquid Menge zu einem Verdünnungseffekt, der sich auf die Intensität des Analytsignals negativ auswirkte.

Deshalb war es wichtig, die geringste mögliche Flüssigkeitsmenge einzustellen. Zum zweiten war die Konsistenz der Sheath liquid von großer Bedeutung. Abhängig von der Protonierbarkeit oder Deprotonierbarkeit der Analyten mußten saure oder alkalische Flüssigkeiten verwendet werden. Dabei war darauf zu achten, daß Gemische eingesetzt wurden, die kompatibel für den Elektrospray waren. Das hieß, die Viskosität des Lösungsgemisches mußte so beschaffen sein, daß ein kontinuierlicher Fluß möglich war.

#### **4.3.6.2 Einfluß am Beispiel von ausgewählten s-Triazinen**

Mit dem Originalinterface wurde der Einfluß verschiedener Sheath liquid-Mischungen auf das Analytsignal einer Mischung aus Hydroxydesethyltriazin, Hydroxysimazin, Hydroxyterbuthylazin und Desethyltriazin untersucht (Abb. 33).



**Abb. 33:** Einfluß der Sheath liquid-Zusammensetzung auf die Signalintensität von Hydroxydesethyltrazin, Hydroxysimazin, Hydroxyterbutyltrazin und Desethyltrazin; CE-Bedingungen: Puffer: 10 mM Natriumborat, pH 10.5, 20 ppm Standards; 30 kV, 15 sec Injektion; CE-Kapillare: 75 cm, 75 µm I.D., 360 µm O.D., ESI-MS-Bedingungen: 4 kV ESI, heated capillary Temperatur: 170 °C, sheath gas: 25 arb; Original-ESI-Interface: auf Position 2 wurde Spray Kopf fixiert. Bitte beachten: Die Peakintegration erfolgte über TIC des Massenspektrums; spätere Integrationen (in nachfolgenden Kapiteln) wurden manuell über die Software (LCQ tune) vorgenommen

Es wurde festgestellt, daß die Mischung Methanol/Wasser/Ameisensäure (50/49/1) mit der Ausnahme von Hydroxyterbutyltrazin die besten Signale ergab. Wurde die Menge an Ameisensäure reduziert, so wurden konsequenterweise auch kleinere Analytsignale erhalten. Das war Ursache des geringeren pH-Wertes und einer dadurch bedingten geringeren Protonierung der Substanzen im Elektrospray.

Wurde das Methanol-Wasser-Gemisch verwendet, so wurde die Linie nicht logisch fortgesetzt. Wurde Ammoniumcarbonat zum Methanol/Wasser-Gemisch gemischt, so nahm die Peakintensität bei Hydroxydesethyltrazin deutlich ab als im Vergleich zu den anderen Analyten.

Insgesamt gesehen konnte mit dem Methanol/Wasser/Ameisensäure (50/49/1)- Gemisch das beste Ergebnis erhalten werden. Diese Mischung wurde mit einer variablen Mischungsverhältnis auch als Standard-Sheath liquid bei Kirby [Kirby et al., 1996] zur Analyse von Peptiden oder bei Yang [Yang et al., 1997] mit obiger Zusammensetzung

(Methanol/Wasser/Ameisensäure (50/49/1)) zur Analytik von ausgewählten s-Triazinen verwendet.

#### 4.3.6.3 Einfluß am Beispiel ausgewählter Adduktverbindungen

Durch Addition eines Ammoniumions an 2- oder 3- oder 4-fach substituierten Carbonsäuren konnten diese als positives Adduktion  $[M+ NH_4]^+$  im Positivmodus gemessen werden (vgl. Abschnitt 4.3.4 ff). Zur Ausbildung eines stabilen Addukts mußten ausreichend Ammoniumionen zur Verfügung stehen. Deshalb wurde ein 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer, pH 10.3 verwendet.

Die Sheath liquid war von besonderer Bedeutung, da sie die Ausbildung des Addukts unterstützte. Aus diesem Grund wurde ein Gemisch aus Methanol/Wasser/Ammoniak (50/49/1) eingesetzt. Damit konnten nur die Addukte der 2- und 3-fach substituierten Carbonsäure erkannt und durch Erhöhung des Ammoniakanteils auf 5 % sogar die 4-fach substituierte Carbonsäure nachgewiesen werden (Tab. 21). Eine weitere Erhöhung des Ammoniakanteils schlug fehl, da starke Unregelmäßigkeiten im Elektrospray auftraten.

Methanol/Wasser/Ammoniak-Zusammensetzung	Phthalsäure [Peakintensität]	1,2,4-Benzentricarbonsäure [Peakintensität]	1,2,4,5-Benzentetracarbonsäure [Peakintensität]
50/49/1	$0.2 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	0
50/45/5	$9.0 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$

**Tab. 21:** Zusammenhang Ausbildung des Ammoniumaddukts in Abhängigkeit der Ammoniakkonzentration in der Sheath liquid, gemessen im Positivmodus, sheath gas 0 arb, sheath liquid @ 1 ml/min; andere CE-ESI-MS-Bedingungen: siehe Abschnitt 4.4.1: CZE-ESI-MS-Messungen von Adduktverbindungen.

Andere Kombinationen wie 10 mM Ammoniumcarbonat (Puffer) und Ammoniak (9.5/0.5) oder 10 mM Ammoniumcarbonat (Puffer) und Ammoniak (9/1) sowie 100 mM Ammoniumcarbonat und Ammoniak (9.5/0.5) schlugen aufgrund einer Inhomogenität des Elektrosprays fehl.

#### 4.3.6.4 Zusammenfassung und Ausblick

In den vorausgegangenen Abschnitten 4.3.-4.3.6 wurde der Einfluß von sheath gas auf wässrige bzw. nichtwässrige Systeme sowie der Einfluß der sheath liquid auf die Spraystabilität und Signalausbildung von ausgewählten Substanzen im CE-ESI-MS-System näher untersucht.

Unter dem Einfluß des sheath gas` konnte eine Beschleunigung der Migrationszeiten von Substanz und EOF sowohl im Wässrigen (organische Carbonsäuren mit unterschiedlicher effektiver elektrophoretischer Mobilität) als auch im Nichtwässrigen (Glykoalkaloide) beobachtet werden. Jedoch konnte nicht unbegrenzt der sheath gas Fluß erhöht werden, da die Spraystabilität wesentlich vom sheath gas Fluß abhängig war. Das nichtwässrige System zeigte sich „empfindlicher“, da schon ein im Vergleich zum wässrigen Medium niedriger Fluß ausreichte, um den Spray instabil werden zu lassen.

Die sheath liquid Konsistenz als auch die Flußrate zeigte eine deutliche Auswirkung auf den elektrischen Kontakt zwischen ESI-needle und heated capillary sowie die Signalausbildung der Analyten.

Generell gesehen konnten mit dem Standardgemisch Methanol/Wasser/Ameisensäure (50/49/1) zur Analytik von positiven Adduktionen  $[M+NH_4]^+$  Analytsignale erhalten werden (vgl. Abschnitt CZE-ESI-MS-Messungen von Ammoniumadduktionen). Die Mischung Methanol/Wasser/Ammoniak (50/45/5) eignete sich nicht nur zur Messungen von positiven Adduktverbindungen, sondern unterstützte ebenso die Ausbildung von negativen Quasimolekülonen  $[M-H]^-$  im Negativmodus (s. Abschnitt 4.4.1 f).

Wie eingangs erwähnt, konnte die zugegebene Sheath liquid-Menge auf 1 µl/min abgesenkt werden. Geringere Flüsse waren mit herkömmlichen kleineren HPLC-Spritzen nicht möglich, da die Flüssigkeit nicht kontinuierlich aus der ESI-Nadel herausfloß. Deshalb wurde versucht die sheath liquid-Leitung zu splitten, was sich jedoch als problematisch herausstellte. Der Fluss der gesplitteten Flüssigkeit war nicht stabil genug.

### 4.3.7 Einfluß der Temperatur der heated capillary auf die Stabilität und Intensität des Analytsignals

#### 4.3.7.1 Theoretischer Hintergrund

Die heated capillary unterstützt die Desolvatisierung der während des ESI-Prozesses produzierten Ionen. Sie kann bei dem Massenspektrometer Thermoquest Finnigan LCQ duo bis zu 300 °C aufgereizt werden (genaue Beschreibung der heated capillary in Sektion 6.2.2.2). Die Ionen werden in die heated capillary gezogen (Atmosphärendruck) und in einem Druckgefälle zu der Skimmer-Region transportiert. Für Messung von Kationen wird zusätzlich eine Spannung von max. + 10 V, für Anionen max. – 10 V an die heated capillary gelegt, um eine Entladung der Ionen an der Innenwand zu verhindern [Handbuch LCQ duo].

Die Temperatur der heated capillary ist für das Analytsignal entscheidend. Solche Stoffe, die thermisch instabil sind, werden beim Auftreffen auf die heated capillary abgebaut, was schließlich keine „weichen“ Bedingungen mehr darstellt. Andere wiederum sind thermisch stabiler, somit „belastbarer“. Die exakte Einstellung muß aber für jede einzelne Substanz zuvor ermittelt werden.

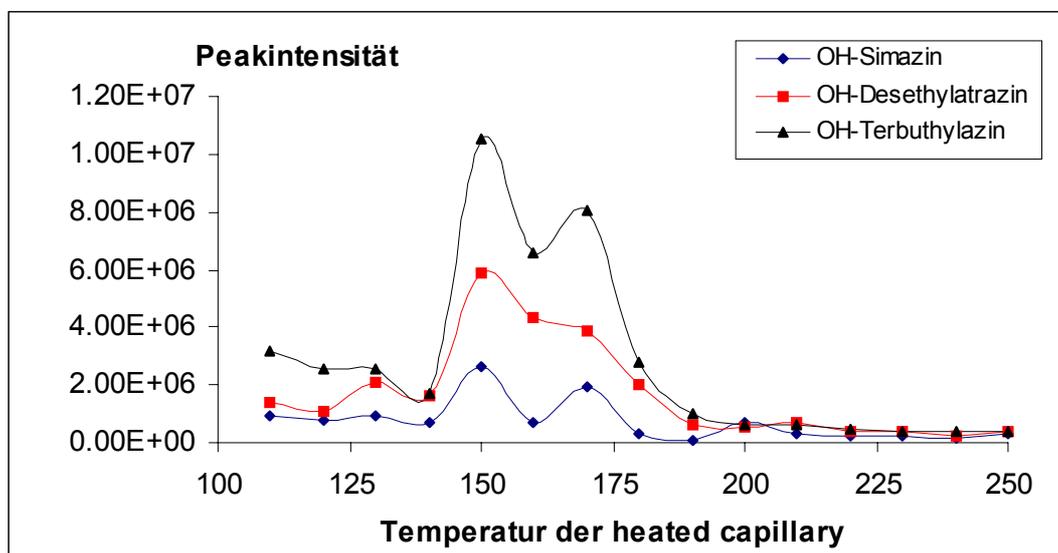
Es muß darauf geachtet werden, daß die Temperatur der heated capillary nicht unter 100 °C eingestellt wird, um ein Eindringen von Wasser bei Verwendung von wässrigen Puffern und Lösungen zu vermeiden.

#### 4.3.7.2 Optimierung der Temperatur für weniger thermisch labile Substanzen (am Beispiel ausgewählter s-Triazine)

Zur qualitativen und quantitativen Messung von **s-Triazinen** wurde der Einfluß der Temperatur der heated capillary untersucht. Drei repräsentative\* Hydroxytriazine (Hydroxysimazin  $m/z = 184$ , Hydroxyterbuthylazin  $m/z = 212$  und Hydroxydesethylatrazin  $m/z = 170$ ) wurden zwischen 110 und 250 °C (Abb. 34) getestet. Dabei ließ sich ein Optimumsbereich um 150-160 °C für die drei untersuchten Hydroxytriazine feststellen.

\* ) repräsentativ bedeutet, daß drei Hydroxytriazine ausgewählt wurden, die einen der s-Triazine entsprechenden  $m/z$ -Bereich abdeckten.

Wurde die Temperatur weiter erhöht, besonders  $> 200\text{ }^{\circ}\text{C}$ , wurden alle drei Analyten thermisch abgebaut.



**Abb. 34:** Einfluß der Temperatur auf drei Hydroxytriazine; CE-Bedingungen: 30 kV, 10 sec Inj (20 ppm Standard). 10 mM Natriumboratpuffer, pH 10.0; ESI-MS-Bedingungen: wie bei Abb. 25 (Seite 86) beschrieben; Anwendung von 20 arb sheath gas Fluß.

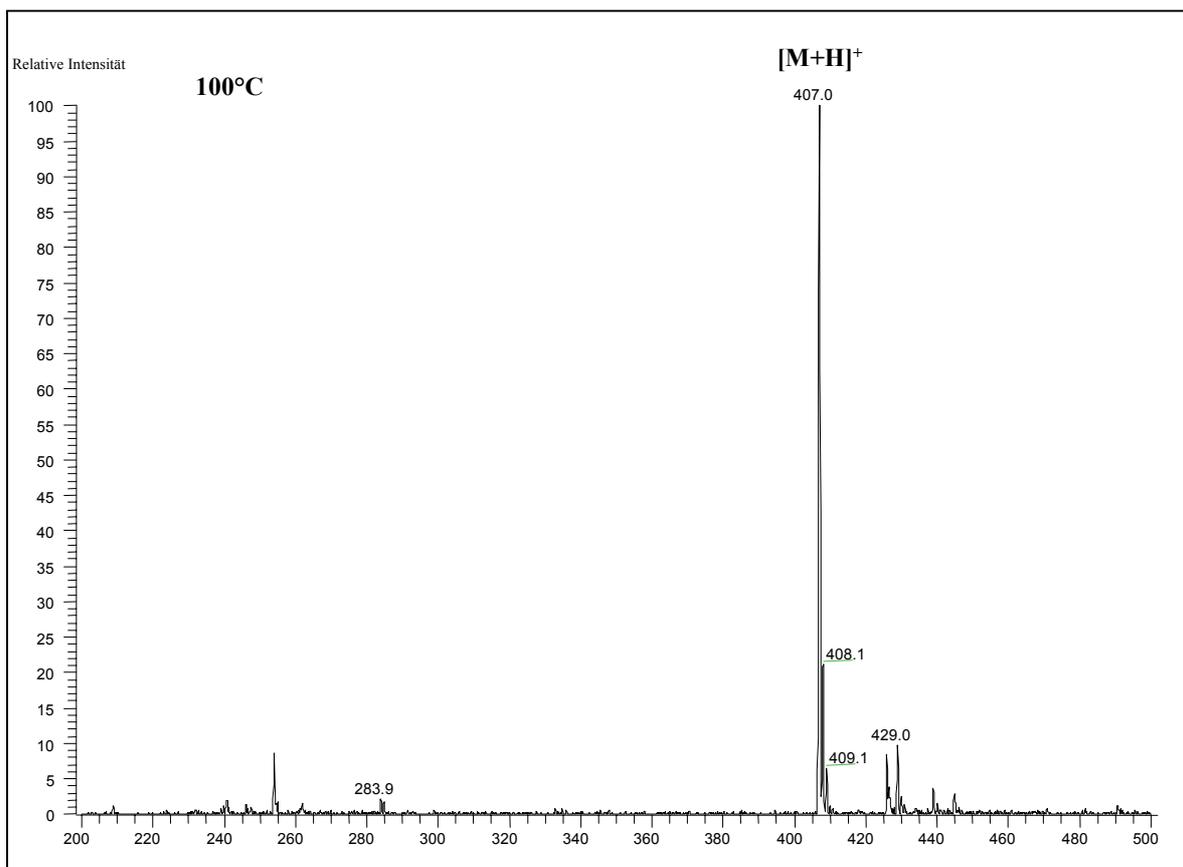
#### 4.3.7.3 Optimierung der Temperatur für thermisch labile Substanzen

**Sulfonylharnstoffe** sind thermisch instabile Substanzen, wodurch eine GC-MS-Bestimmung unmöglich ist [Garcia et al., 1992]. Deshalb eignen sich HPLC-ESI-MS bzw. CE-ESI-MS-Kopplungen, da hier eine Ionisierung unter weichen Bedingungen möglich ist. Jedoch spielt die Temperatur der heated capillary für die Ausbildung des Analytsignals eine wesentliche Rolle.

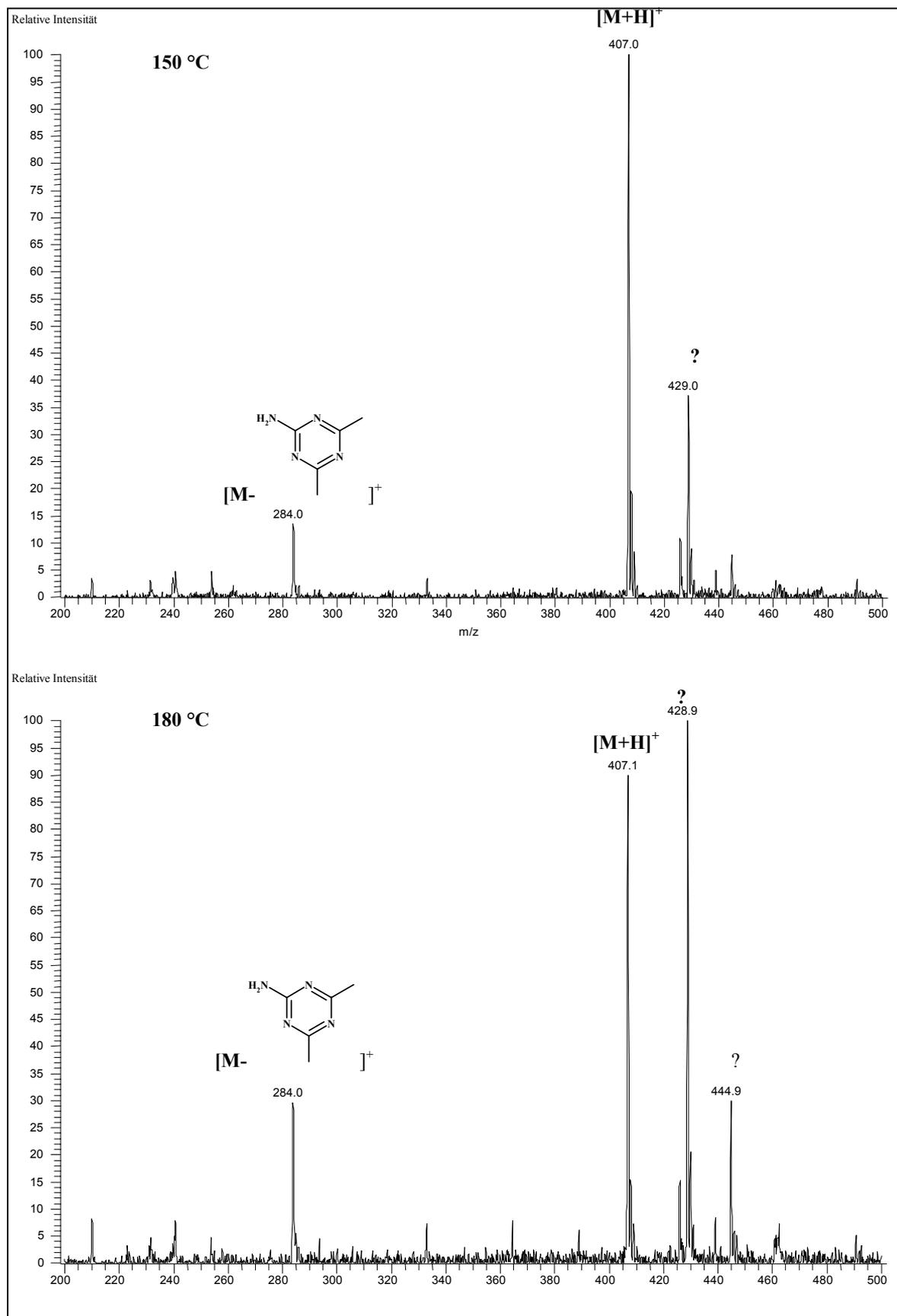
Im Bereich von 100-180  $^{\circ}\text{C}$  wurde der Einfluß der Temperatur auf drei Sulfonylharnstoffe (Oxasulfuron, Triasulfuron und Thifensulfuron: vgl. auch Abschnitt 4.4.3) untersucht. Am Beispiel von Oxasulfuron wird in Abb. 35 gezeigt, daß bei 150 und 180  $^{\circ}\text{C}$  ein Abbau unter Bildung von Adduktverbindungen stattfand. Bei 100  $^{\circ}\text{C}$  blieb die Signalintensität von Oxasulfuron stabil.

Von Oxasulfuron wurde auf Triasulfuron und Thifensulfuron geschlossen und somit wurden für weitere Messungen die Temperatur der heated capillary auf 100  $^{\circ}\text{C}$  eingestellt.

Zur Messung von Adduktverbindungen (vgl. Abschnitt 4.4.1; Anlagerung von Ammoniumionen an mehrfach substituierte Carbonsäuren) mußte die Temperatur ebenfalls nivelliert werden. Zwar wurde die Stabilität des Adduktes von Phthalsäure zwischen 50 und 280 °C untersucht – es wurde ein optimaler Bereich von 70 °C gefunden –, für CZE-ESI-MS-Messungen aber wurde die Temperatur auf 100 °C eingestellt, um ein Eindringen von Wasser (vgl. Abschnitt 4.3.7.1) ins MS zu vermeiden.



**Abb. 35:** Temperatureinflüsse (100, 150, 180 °C) auf die Stabilität des Analytsignals von Oxasulfuron ( $m/z = 407$ ), weitere Einzelheiten siehe Abb. 35 Fortsetzung.



**Abb. 35 (Fortsetzung):** Temperatureinflüsse (100, 150, 180 °C) auf die Stabilität des Analytsignals von Oxasulfuron ( $m/z = 407$ ), gefundenes Abbaufragment  $m/z = 284$  (Abspaltung eines Triazinrestes durch  $\alpha$ -Spaltung der Carbonylgruppe der Harnstofffunktion (vgl. Kapitel 4.4.3) bzw. - Addukte  $m/z = 429, 449$ .

### 4.3.8 Abstand ESI-needle zu heated capillary und Optimierung der Sprayspannung sowie CE-Kapillarenabstand

#### 4.3.8.1 Theoretischer Hintergrund

Im Gegensatz zum Original-ESI-Interface konnte bei dem modifizierten ESI-Interface (Beschreibung: siehe Abschnitt 6.2 ff) der Abstand ESI-needle zu heated capillary auf jeden beliebigen Abstand justiert werden. Das bedeutete, dass der Abstand zusammen mit der Sprayspannung für maximale Peakintensität optimiert werden musste. Ein weiterer wichtiger Parameter war der CE-Kapillarenabstand. Abhängig davon, inwieweit die CE-Kapillare aus der ESI-needle hervorstand, wurde die austretende Flüssigkeit mehr oder weniger stark von der sheath liquid umspült.

Zunächst wurde der optimale Abstand unter gleichbleibender ESI-Spannung ermittelt. Anschließend wurde die Sprayspannung und schließlich der CE-Kapillarenabstand an dem besten Bereich optimiert.

Ziel war das Herausfinden des Abstandes und der Sprayspannung sowie des CE-Kapillarenabstands, an dem die Signalintensität von ausgewählten Substanzen maximal war. Es wurden s-Triazin-Herbizide als Modellsubstanzen eingesetzt, die im Positivmodus als positive Quasimoleküle  $[M+H]^+$  detektiert werden konnten.

Zur Optimierung kamen zwei Systeme zum Einsatz: Einmal wurden 50  $\mu\text{m}$  I.D. (360  $\mu\text{m}$  O.D.) – Kapillaren und die CE-ESI-nozzle\* und zweitens 50  $\mu\text{m}$  I.D. (190  $\mu\text{m}$  O.D.) - Kapillaren sowie eine HPLC-ESI-nozzle\* verwendet. Beide „nozzles“\* unterschieden sich im Innendurchmesser, wodurch in der CE-ESI-nozzle CE-ESI-Nadeln (I.D. 4 mm) eingesetzt werden konnten, in die CE-Kapillaren mit 360  $\mu\text{m}$  O.D. hindurchpassten. In der HPLC-ESI-nozzle wurden ESI-Nadeln mit kleinerem I.D. (2 mm) eingesetzt.

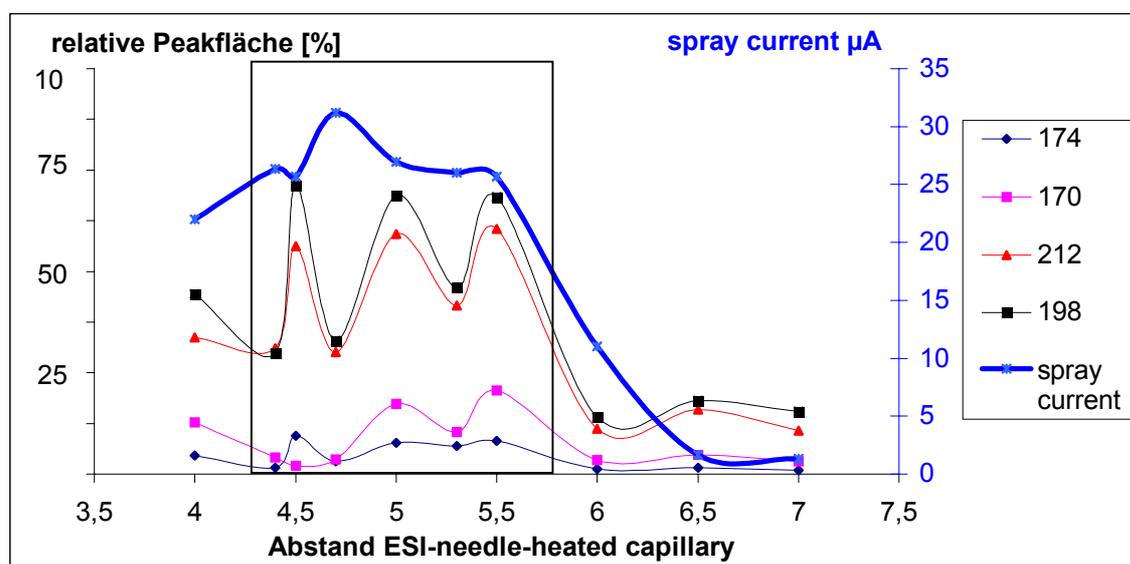
---

\*) Der Begriff „nozzle“ repräsentiert die Elektrospray-Einheit, die in den Spray-Kopf eingeschraubt werden kann (vgl. auch Abschnitt 6.2 ff).

### 4.3.8.2 Optimierung der Signalintensität mit 50 $\mu\text{m}$ I.D. (360 $\mu\text{m}$ O.D.) - Kapillaren unter Verwendung der CE-ESI-nozzle\*

Zur Optimierung wurden vier s-Triazine herangezogen, namentlich Hydroxydesethylatrazin ( $m/z = 170$ ), Desisopropylatrazin (DIA,  $m/z = 174$ ), Hydroxyatrazin ( $m/z = 198$ ) sowie Hydroxyterbuthylazin ( $m/z = 212$ ). Bei einem 10 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 4.5 wurde zwischen einem Abstand (ESI-needle zu heated capillary) von 4 und 7 mm gemessen (Abb. 36). Desisopropylatrazin konnte als EOF-Marker verwendet werden; der Spray-current wurde für DIA im MS gemessen.

Innerhalb des Bereiches von ca. 4.5 –5.5 mm konnten für die Hydroxytriazine Signale erhalten werden. Mit zunehmendem Abstand nahmen die Signalintensitäten sowie gleichzeitig der Spray-current ab. Unter einem Abstand von 4 mm konnte nicht gemessen werden, da Überspannungen auftraten.



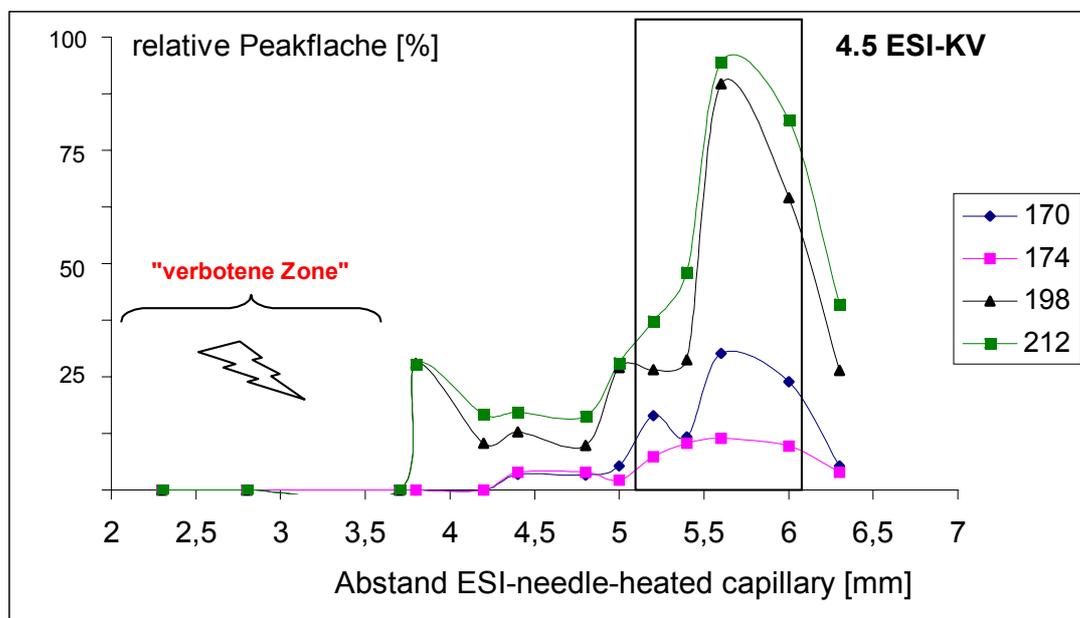
**Abb. 36:** Ermittlung des Abstandes ESI-needle zu heated capillary mit 50  $\mu\text{m}$  I.D. (360  $\mu\text{m}$  O.D.)- Kapillaren unter Verwendung der CE-ESI-nozzle. ( $m/z$ ) 170 = Hydroxydesethylatrazin; ( $m/z$ ) 174 = Desisopropylatrazin; ( $m/z$ ) 198 = Hydroxyatrazin; ( $m/z$ ) 212 = Hydroxyterbuthylazin; Spray-current: gemessen an DIA; Konzentration Standardgemisch: 25 ppm; 77 cm Kapillare ; 10 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 4.5; 25 kV; ESI-MS-Bedingungen: sheath gas: 10 arb; ESI-Spannung: 4.8 kV, 0.13 Abstand CE-Kapillare aus ESI-needle, sheath liquid @ 2.5  $\mu\text{l}/\text{min}$ : Methanol/Wasser/Ameisensäure: 50/50/1; Temperatur der heated capillary: 160  $^{\circ}\text{C}$  .

Wie sich in den Abschnitten 4.3.9 und 4.3.3 herausstellte, lag bei einem Abstand von 5 mm und einer ESI-Spannung von 5-5.2 ESI-kV ein Optimumsbereich vor. Im Rahmen der oben dargestellten Messungen aber war es zunächst wichtig herauszufinden, in welchem Bereich maximale Signale erhalten werden konnten. Somit waren die ermittelten Abstandswerte erste „Screening-Werte“, die als Maßstab für spätere Untersuchungen dienten.

#### 4.3.8.3 Optimierung der Signalintensität mit 50 $\mu\text{m}$ I.D. (190 $\mu\text{m}$ O.D.)-Kapillaren unter Verwendung der HPLC-ESI-nozzle

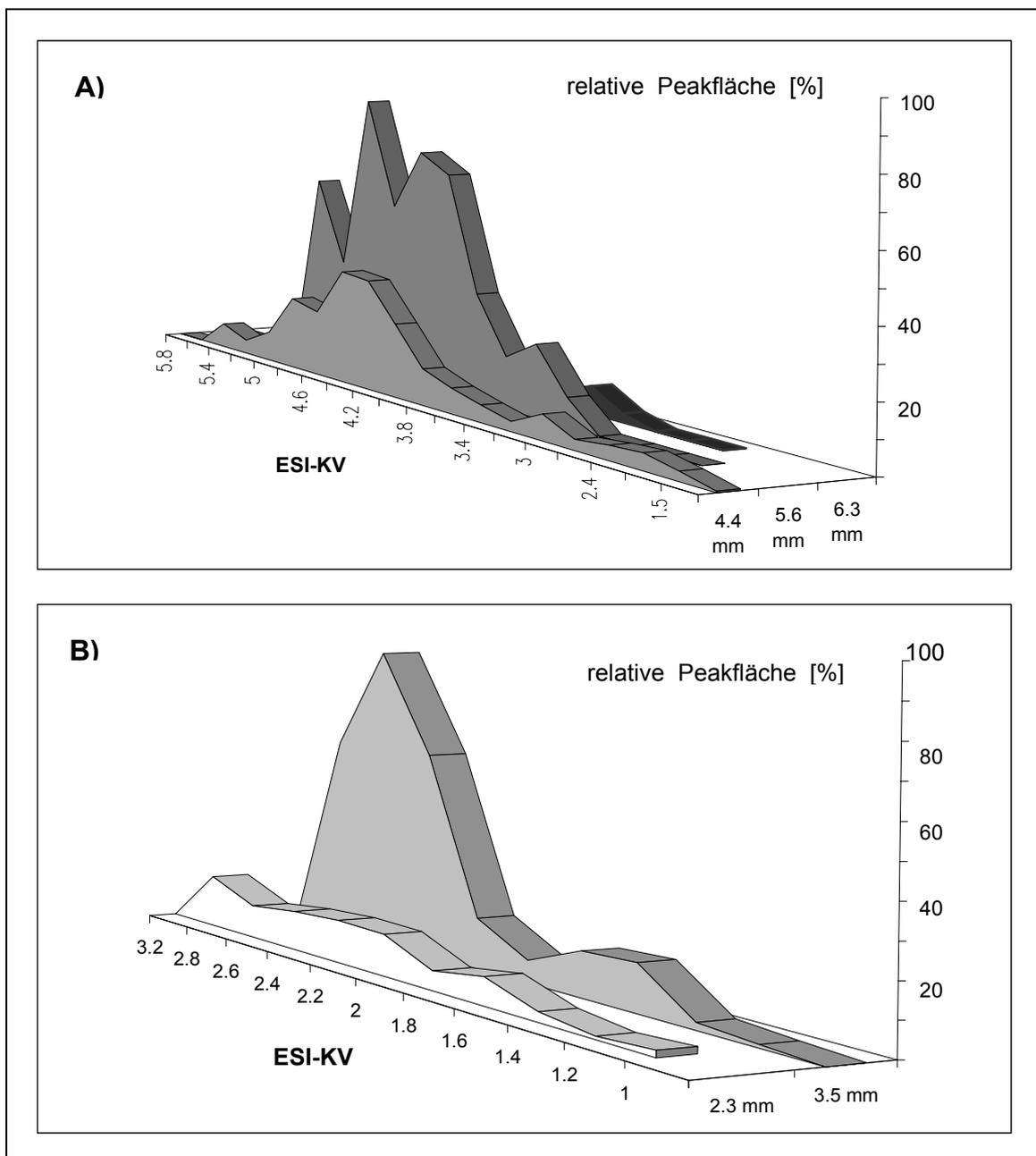
Der Sinn der Verwendung der 50  $\mu\text{m}$  I.D. (190  $\mu\text{m}$  O.D.) - Kapillaren mit der HPLC-ESI-nozzle sollte eine Verringerung des Ausströmungsquerschnitts der Flüssigkeit sein, die mit der sheath liquid in Kontakt kam.

In Abb. 37 wurde der Abstand ESI-needle zu heated capillary bei gleichbleibender ESI-Spannung mit einem 10 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 6.8 ermittelt. Unter ca. 4 mm trat eine „verbotene Zone“ auf, in der mit 4.5 ESI-KV Überspannungen auftraten. Um 5 bis 6 mm wurde eine hohe Peakintensität verzeichnet, die ab ca. 6.5 mm wieder abnahm.

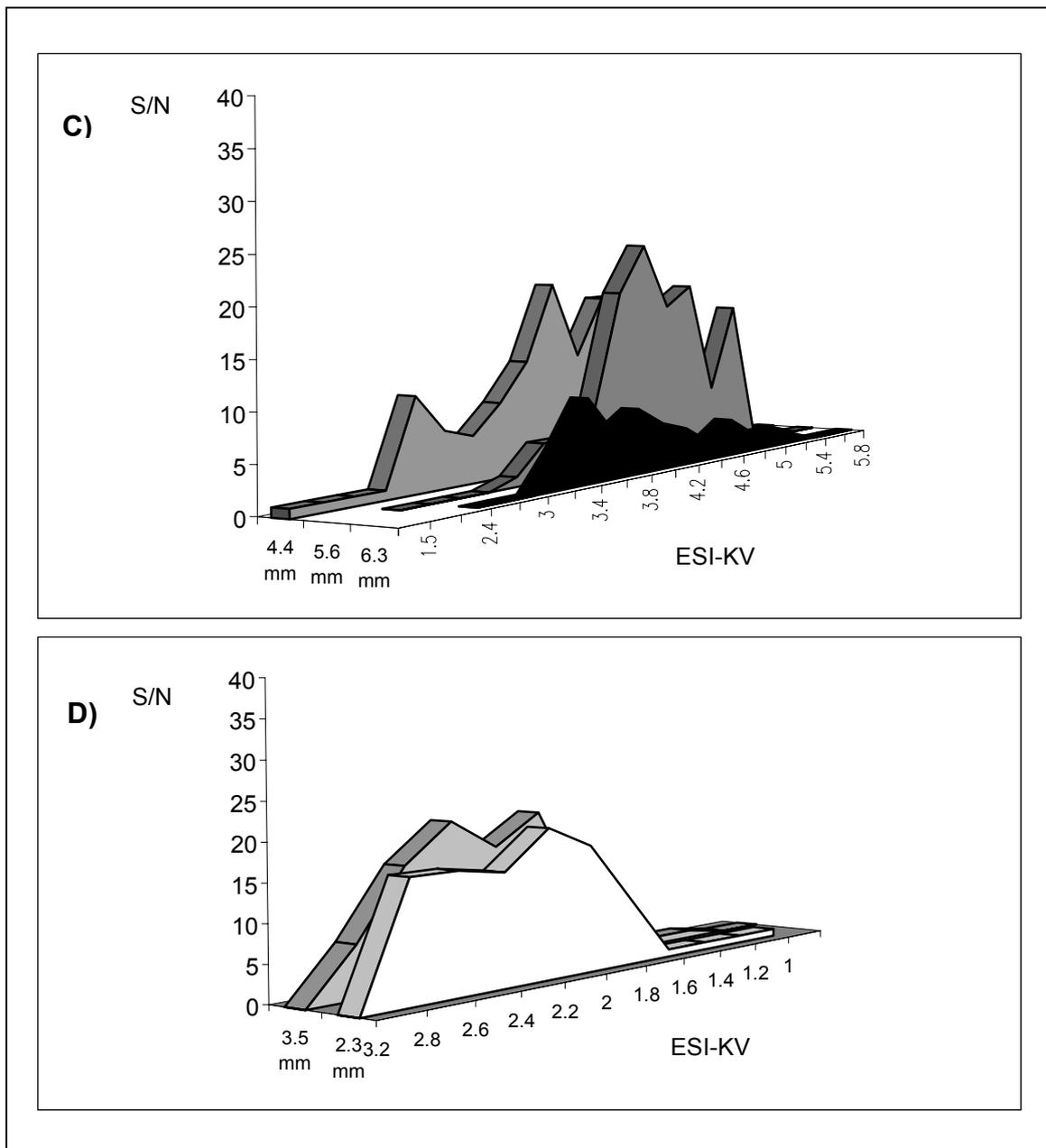


**Abb. 37** : Ermittlung des Abstandes (mm) ESI-needle zu heated capillary mit 50  $\mu\text{m}$  I.D. (190  $\mu\text{m}$  O.D.) – Kapillaren; CE-Bedingungen: 10 mM Ammoniumacetat, pH 6.8; 25 ppm Standardgemisch (vgl. Abb. 32), 25 kV; ESI-MS-Bedingungen: sheath gas: 5 arb; heated capillary 160 °C; Sprayspannung: 4.5 kV; sheath liquid: Methanol/Wasser/Ameisensäure @ 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; jeder Punkt entspricht einer CE-ESI-MS-Messung.

Charakteristische Abstände aus Abb 37. wurden ausgewählt (2.3 , 3.5 , 4.4, 5.6 und 6.3 mm), an denen eine Optimierung der Sprayspannung vorgenommen wurde. Abb. (38 a-d). Zur Vereinfachung der folgenden Abbildungen wurde nur  $m/z = 212$  dargestellt, da diese Substanz die größte relative Peakintensität besaß.



**Abb. 38 a,b:** Optimierung der Sprayspannung bei konstant eingestelltem Abstand (ESI-needle zu heated capillary in mm) unter Verwendung eines 10 mM Ammoniumacetatpuffers, pH 6.8, dargestellt sind die relativen Peakintensitäten, die korrespondierenden Signal-Rausch-Verhältnisse (S/N) sind in Abb. 38 c,d verzeichnet. Nur  $m/z = 212$  wurde zur Darstellung verwendet.



**Abb. 38 c,d:** Zu Abb. 38 a,b korrespondierende Signal-Rausch-Verhältnisse (S/N)

Im Verlauf wurde deutlich, daß bei einem Abstand von 3.5 und 5.6 mm die Signalintensitäten bei 3.6 bzw. 4.0 ESI-kV am höchsten waren. Minima waren bei einem Abstand von 2.3 und 6.3 mm zu verzeichnen. Betrachtete man den Verlauf der Optimums-ESI-Spannung zwischen 2.3 und 6.3 mm, so wurde deutlich, daß bis zu einem Abstand von 4.4 das ESI-Optimum von 2.8 über 3.6 zu 4.4 anstieg, während dagegen bei 5.6 und 6.3 mm Werte von 4 und 4.2 erreicht wurden. Das Signal-Rausch-Verhältnis lag bei 6.3 mm unter 10 für alle 4 Substanzen,

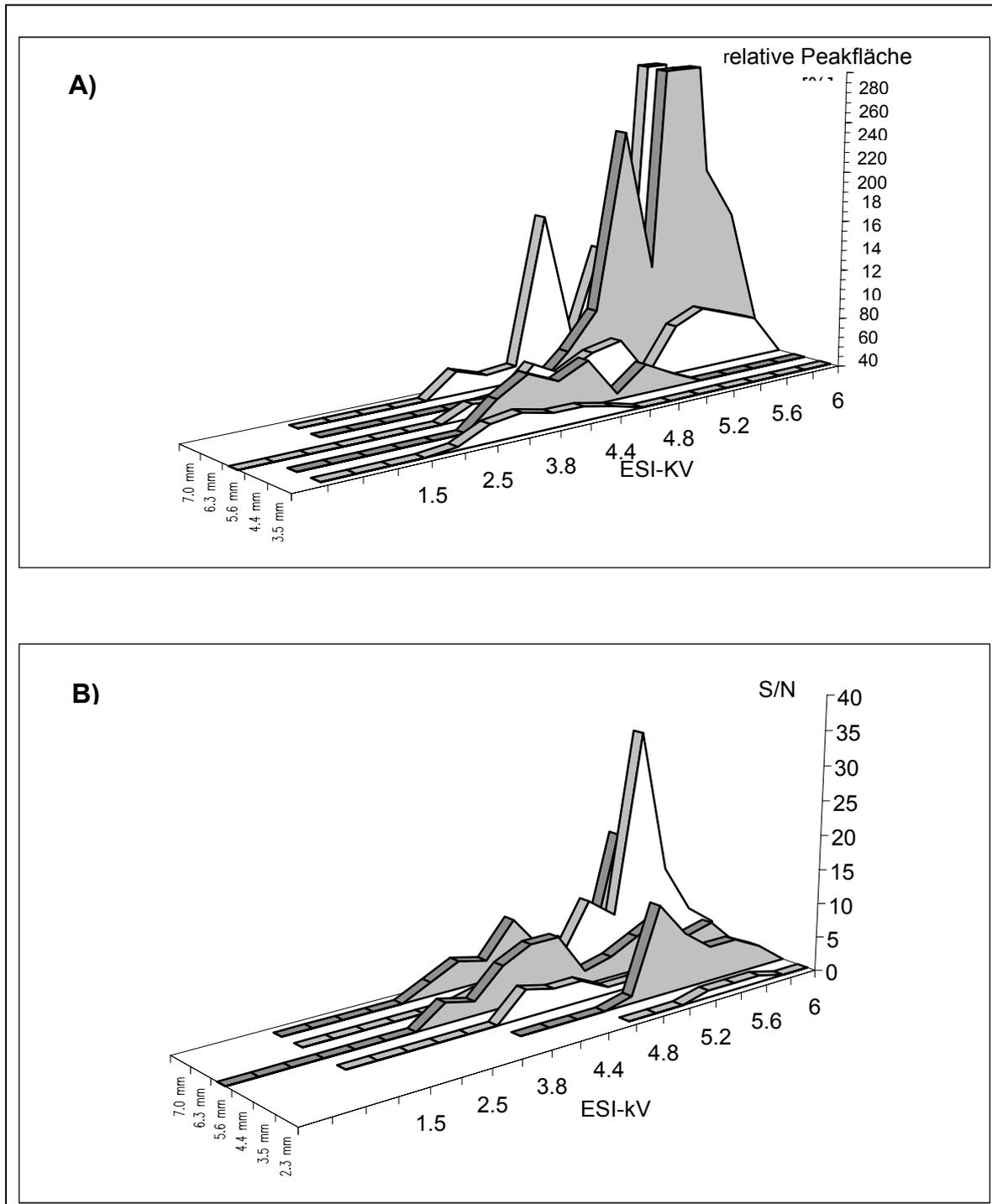
ein Optimum war vor allem bei 3.5 mm festzustellen, bei 5.6 mm ein zweites Optimum, das ein wenig von den Werten von 3.5 mm abwich.

Kleinste Änderungen im Abstand hatten größte Auswirkungen auf die Ausbildung des Flüssigkeitsfilamentes. Das war bei 3.5 mm zwischen 3.2 und 3.6 ESI-kV besonders zu beobachten, wobei bei 3.6 ESI-kV eine „Optimums-Spitze“ auftrat, die bei geringem Erhöhen um 0.2 bzw. 0.4 ESI-KV deutlich wieder abnahm. Bei 5.6 mm lag der Optimumsbereich um 4 ESI-kV, bei Erhöhung um 0.4 bzw. Erniedrigung um 0.4 ESI-kV war keine so dramatische Änderung zu erkennen. Offenbar wurde bei 3.5 mm ein Bereich eingestellt, der zwar Signale mit hoher Intensität hervorrief, die stabile Ausbildung des Flüssigkeitsfilamentes aber nicht gewährleistete.

In Experimenten wurde der Abstand ESI-needle zu heated capillary unter Verwendung eines 10 mM Ammoniumcarbonat, pH 9.5 näher untersucht (Abb. 39 a, b, ).

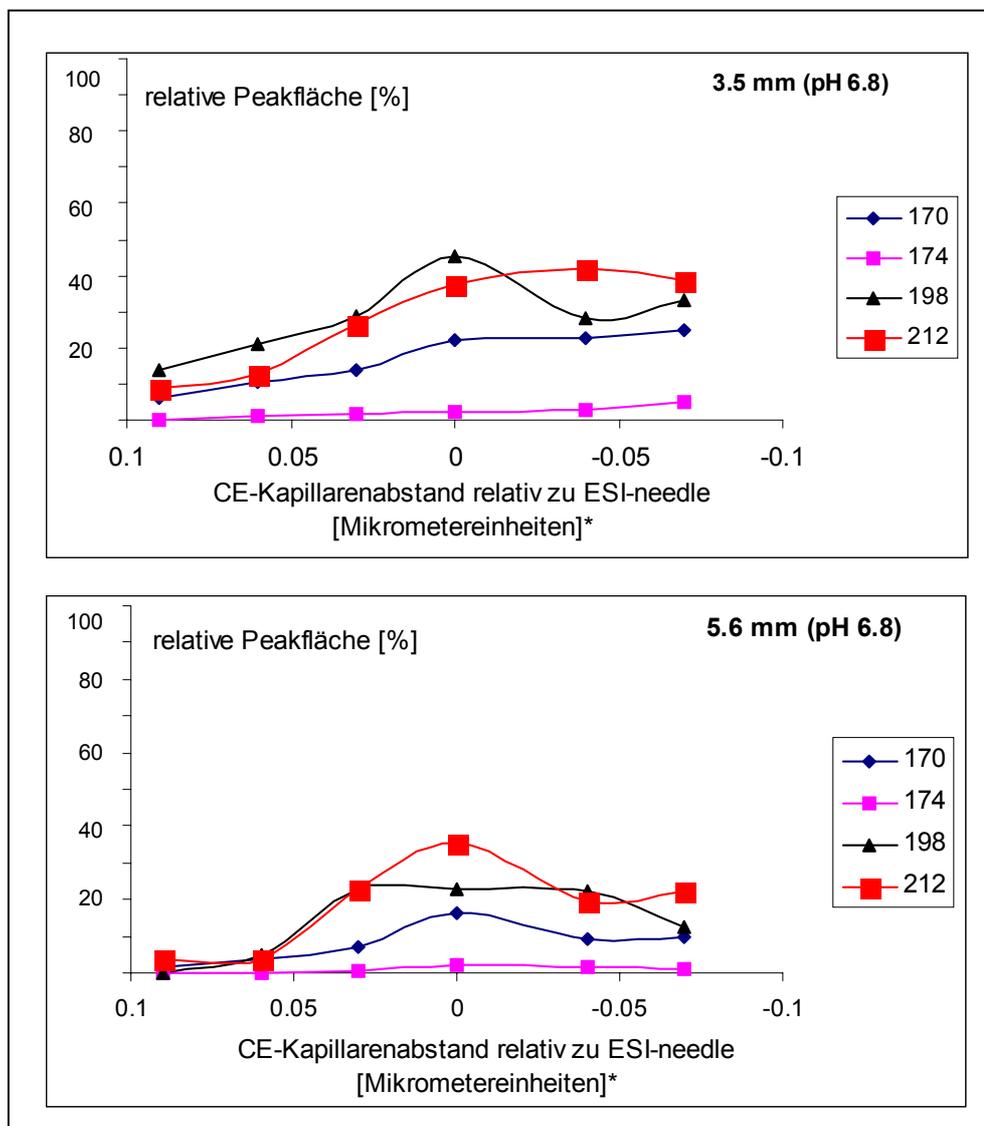
Wie aus Abbildung 39 a hervorging trat bei ca. 5.5 ESI-kV (7.0 mm sowie 6.3 mm) eine Optimumspitze der Signalintensität sowie Signal-Rausch-Verhältnis aller vier untersuchten s-Triazine hervor. Bei Verringerung des Abstandes (5.6, 4.4 mm) verschob sich die Optimumssignalintensität zu niedrigeren Werten. Dabei mußte auch eine geringere Sprayspannung angewandt werden. Bei einer weiteren Reduzierung des Abstandes verschob sich die Signalintensitäten und Signal-Rausch-Verhältnisse zu geringeren Werten hin (3.5 mm, Abb. 39 b). Bei 2.3 mm konnte keine stabiles Signal mehr ausgebildet werden. Der Abstand war zu klein.

Im Gegensatz zu Messungen bei pH 6.8, wo maximale Einstellungen bei 3.5 und 5.6 mm (3.8 bzw. 4.0 ESI-kV) erhalten wurden, konnten bei pH 9.5 Maximalwerte um 5.6 mm (4.6 ESI-kV) gefunden werden. Bei direktem Vergleich von Signalintensität und Signal-Rausch-Verhältnis fielen im Falle der pH 9.5 – Messungen durchwegs geringere Werte auf. Nur bei einem Abstand von 6.3 und 7.0 mm (5.4 ESI-kV) konnten deutlich höhere Peakintensitäten erhalten werden. Das würde bedeuten, daß bei hohem pH der Abstand von ESI-needle zu heated capillary sowie die Sprayspannung erhöht werden muß. Das würde die Ursache eines stärkeren Elektrosprays sein. Bei geringerem pH müßte der Abstand sowie die Sprayspannung aufgrund eines schwächeren Elektrosprays reduziert werden.



**Abb. 39** : Optimierung der Sprayspannung bei konstant eingestelltem Abstand (ESI-needle zu heated capillary in mm) unter Verwendung eines 10 mM Ammoniumacetatpuffers, pH 6.8, dargestellt sind die relativen Peakintensitäten **(A)**, die korrespondierenden Signal-Rausch-Verhältnisse (S/N): **(B)**. Nur  $m/z = 212$  wurde zur Darstellung verwendet.

Für die oben beschriebenen Messungen (10 mM Ammoniumacetat, pH 6.8) wurde der CE-Kapillarenabstand bei zwei verschiedenen Abständen (ESI-needle zu heated capillary) untersucht (Abb. 40).



**Abb. 40:** Optimierung des CE-Kapillarenabstands bei zwei verschiedenen Abständen ESI-needle zu heated capillary (3.5 mm und 5.6 mm). \*) Mikrometereinheiten: 0.1 Einheiten entsprechen 0.25 mm. Der negative CE-Kapillarenabstand bedeutet, dass sich die CE-Kapillare innerhalb der ESI-needle befand, während positive Werte aussagten, dass die CE-Kapillare aus der ESI-needle hervorstand. CE- und ESI-MS-Bedingungen: siehe Abbildung 37

Man erkannte deutlich, daß mit Zunahme des CE-Kapillarenabstandes bei einem Abstand ESI-needle zu heated capillary 3.5 und 5.6 mm die Signalintensität der Analyten abnahm. In folgenden Experimenten wurde die CE-Kapillare so eingestellt, daß sie bündig mit der ESI-

needle abschloss (= 0), da bei dieser Einstellung die maximale Peakintensität erhalten werden konnte.

Zusammenfassend ließ sich sagen, dass der Abstand ESI-needle für eine maximale Peakintensität zu heated capillary in Abhängigkeit zum pH-Wert der Pufferlösung stand. Mit zunehmendem pH-Wert müsste der Abstand und die angelegte Sprayspannung aufgrund eines stärkeren EOF erhöht werden, während dagegen bei niedrigem pH der Abstand und die Sprayspannung reduziert werden müsste.

Bei bündigem Abschluss der CE-Kapillare mit der ESI-needle konnten aufgrund einer Vermischung der aus der CE-Kapillare austretenden Flüssigkeit mit der sheath liquid die besten Signalintensitäten erhalten werden.

Was würde passieren, wenn zur Analyse von den Modellsubstanzen nicht eine Kapillare mit 50  $\mu\text{m}$  I.D. und 77 cm Gesamtlänge, sondern eine Kapillarenkopplung mit Kapillaren gleichen oder unterschiedlichem Durchmessers kombiniert würden? Wäre eine Verbesserung des Elektrosprays in Abhängigkeit von ESI-Spannung und Abstand ESI-needle zu heated capillary zu erwarten?

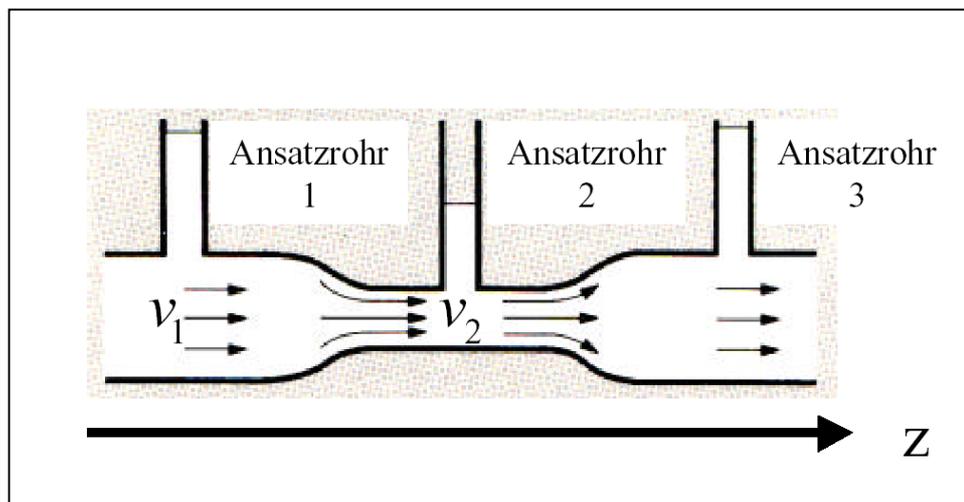
Das wurde im nachfolgendem Kapitel erörtert.

### 4.3.9 Kopplung zweier Kapillaren mit gleichem und unterschiedlichem Durchmesser

Wie im vorausgegangenen Kapitel angedeutet, war das Ziel der Kopplung zweier Kapillaren gleichem oder unterschiedlichem Durchmessers herauszufinden, ob Verbesserungen, nicht nur in den Migrationszeiten, sondern auch in der Spraystabilität und somit in der Signalintensität auftraten.

#### 4.3.9.1 Theoretischer Hintergrund – Der Venturi Effekt

Bei Änderung eines Rohrquerschnitts ändert sich nicht nur die Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit (z.B. Wasser), sondern auch der Druck [Haas, 1988]. Wird durch eine Querschnittsverkleinerung der Röhre die Strömungsgeschwindigkeit erhöht, so wird jedes Teilchen der Flüssigkeit beschleunigt in Richtung der die Beschleunigung verursachenden Kraft. Das heißt auch, daß mit zunehmender Strömungsgeschwindigkeit der Druck sinkt (=Venturi-Effekt). (Abb. 41).



**Abb. 41:** Die Venturi - Röhre Venturi-Effekt: Mit zunehmender Strömungsgeschwindigkeit einer Flüssigkeit sinkt der Druck (Bild aus: [www.physik.uni-bielefeld.de/experi/d2/d2vorles/ah\\_p1\\_v26.pdf](http://www.physik.uni-bielefeld.de/experi/d2/d2vorles/ah_p1_v26.pdf)),  $v_{1,2}$  = Geschwindigkeit der Lösung;  $Z$  = Zeitachse

Praktisch kann dieser Venturi-Effekt in der CE-ESI-MS dadurch eingesetzt werden, indem zwei Kapillaren mit unterschiedlichem Durchmesser gekoppelt werden. Das heißt eine Kapillare mit größerem Durchmesser wird mit einer Kapillare mit kleinerem Durchmesser

verbunden. Dadurch kommt es zu einer Beschleunigung der gesamten Lösung nach Eintritt in die Kapillare mit kleinerem Innendurchmesser (s.o.). Ebenfalls sind kleinere Migrationszeiten der Analyten und des EOF zu erwarten. Diese beschleunigte Flüssigkeit wird dementsprechend ein anderes Sprayverhalten im Elektrospray gegenüber der nichtbeschleunigten Lösung haben.

#### 4.3.9.2 Einsatz der „Venturi-Kapillaren“ in CE-ESI-MS

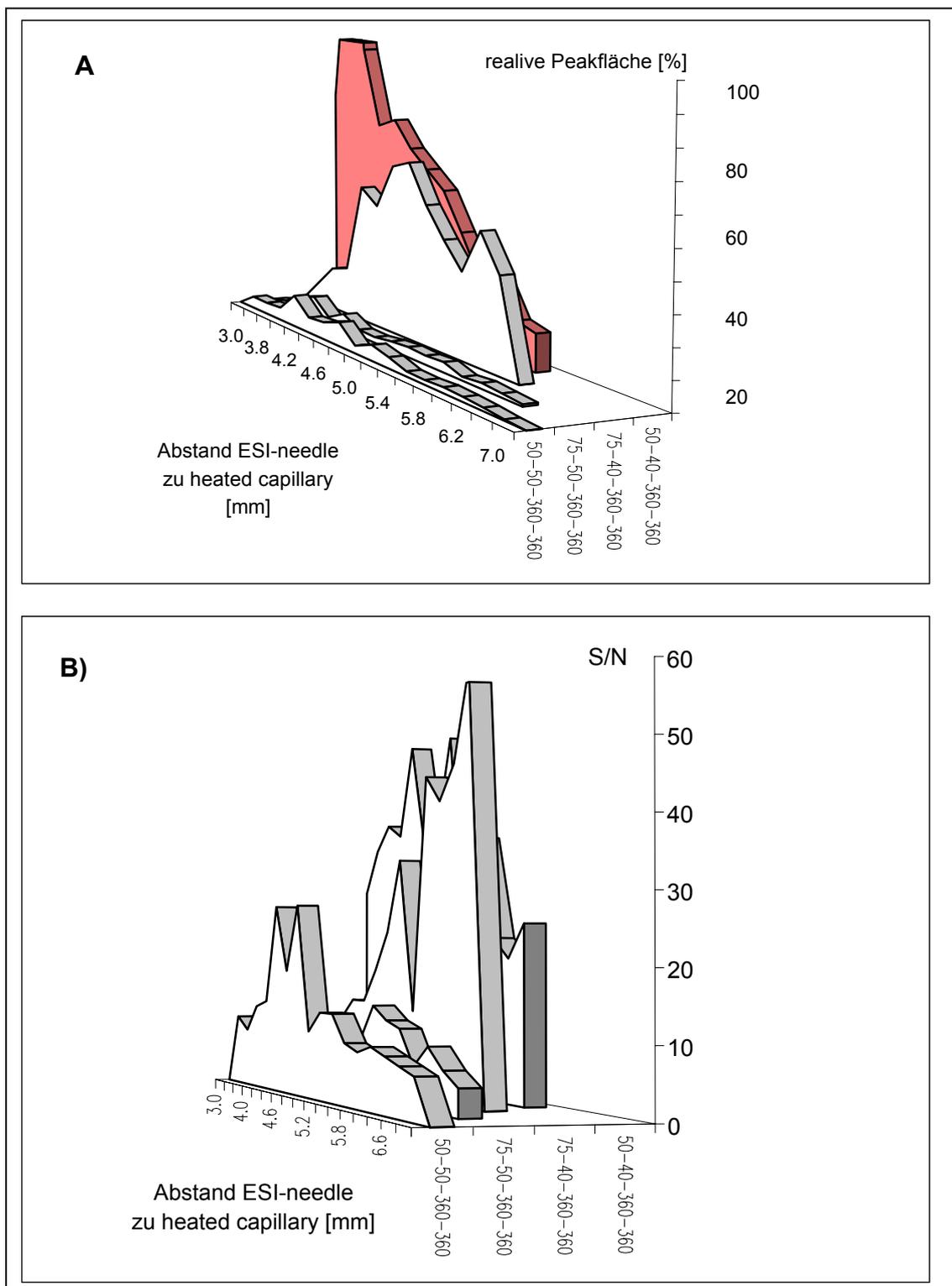
Als Modellsubstanzen wurden vier s-Triazine eingesetzt, namentlich Hydroxydesethylatrazin ( $m/z = 170$ ), Desisopropylatrazin ( $m/z = 174$ ), Hydroxyatrazin ( $m/z = 198$ ) und Hydroxyterbuthylazin ( $m/z = 212$ ). Eine Trennung der Substanzen erfolgte bei diesem pH nicht, jedoch war es zunächst wichtig, verschiedene Massenbereiche abzudecken. Für die folgenden Abbildungen wurde  $m/z = 212$  zur Darstellung ausgewählt, da es im Vergleich zu den anderen Substanzen die größte relative Peakflächen aufwies.

Für die Kopplung zweier Kapillaren wurden folgende Kombinationen angewendet ID(1)-ID(2)-OD(1)-OD(2) in  $\mu\text{m}$ :

- 50-50-360-360
- 75-50-360-360
- 75-40-360-360
- 50-40-360-360

Aus rein praktischer Sicht muß ergänzt werden, daß die Kapillaren (besonders die 40  $\mu\text{m}$  I.D.- Kapillare) gut gespült werden mußte, um ein Verstopfen und somit irreproduzierbare Ergebnisse zu vermeiden.

Die Kapillarenkopplung 75-50-360-360 zeigte gegenüber 50-50-360-360 eine verminderte Peakintensität und Signal-Rauschverhältnis. Das war in erster Linie in der von 15 auf 5 sec. reduzierten Injektionszeit zu sehen. Bei den weiteren in Abb. 42 beschriebenen Kopplungen wurden 5 sec. Probenlösung injiziert.



**Abb. 42:** Optimierung der Kopplung von zwei Kapillaren unterschiedlichen Durchmessers **A)** relative Peakflächen, **B)** korrespondierende S/N. CE-Bedingungen: 30 kV, 15 sec Inj (50-50-360-360) und 5 sec Inj (alle anderen Kapillarenkopplungen), Puffer: 10 mM Ammoniumacetat, pH 6.8, Analytkonzentrationen: je 6.2 mg/l; MS-Bedingungen: sheath gas: 5 arb (50-50-360-360), alle anderen Kapillarenkopplungen: 0 arb, sheath liquid: Methanol/Wasser/Ameisensäure: 50/49/1: 1.0  $\mu$ l/min, ESI-KV: 4, Abstand CE-Kapillare von ESI-needle: 0, heated capillary: 160  $^{\circ}$ C.; Analyt: m/z = 212: Hydroxyterbutylazin

Im Gegensatz zu der Kopplung 75-40-360-360 zeigte die Kombination 50-40-360-360 (Abb.41) mit abnehmendem Abstand ESI-needle zu heated capillary eine Erhöhung der Signalintensität verbunden mit einem durchwegs höherem Signal-Rauschverhältnisses. Ab ca. 4 mm nahm die relative Peakfläche zu, während dagegen das Signal-Rausch-Verhältnis abnahm. Unterhalb 4 mm wurde zwar ein Spray erhalten, der aber für weitere Messungen aufgrund der Inhomogenität relative Peakfläche zu Signal-Rausch-Verhältnis nicht verwendet wurde. In der Kopplung 75-40-360-360 wurde mit zunehmendem Abstand eine Reduzierung der Signalintensität bei gleichzeitiger Zunahme des Signal-Rausch-Verhältnisses beobachtet. Das war Ursache eines unvollständig aufgebauten Sprays, was in einem Verlust der Hintergrundsignale und eines deswegen vermeintlich erhöhten Signal-Rausch-Verhältnisses resultierte.

Insgesamt betrachtet ergab die Kopplung 50-40-360-360 das beste Ergebnis im Vergleich zu den anderen Kapillarenkopplungen, jedoch war unterhalb 4 mm eine Inhomogenität zwischen relativer Peakfläche und Signal-Rauschverhältnisses zu beobachten. Im Vergleich zu der nicht gekoppelten Kapillare (50  $\mu\text{m}$  I.D. und 77 cm Länge, vgl. Abschnitt 4.3.8 ff) und der Kopplung mit zwei Kapillaren gleichem Durchmessers konnte eine Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses von ca. 25 auf über 40 unter gleichzeitiger Erhöhung der relativen Peakfläche erhalten werden. Trotz der Erhöhung de S/N-Verhältnisses und der relativen Peakfläche ist diese Kombination aus praktischer Sicht nicht zu empfehlen, da sehr verstärkt auf ein Verstopfen der gesamten Kapillarenkopplung geachtet werden mußte. Kopplungen mit mehr als 40  $\mu\text{m}$  geringerem I.D. wurden zwar getestet, waren aber für die Messungen im Rahmen der Optimierung der CE-ESI-MS ungeeignet.

#### **4.4 Anwendung der Optimierung der CE-ESI-MS für die qualitative und quantitative Analyse ausgewählter polarer, organischer Substanzen**

Ziel der Anwendung der Optimierung war es durch Kenntnis der Parameter, die eine CE-ESI-MS-Trennung beeinflussten, die qualitative und quantitative Analyse von ausgewählten polaren, organischen Substanzen mit maximaler Detektionssensitivität zu ermöglichen.

Im ersten Schritt der Anwendung wurden Adduktverbindungen sowie deren korrespondierenden Carbonsäuren näher untersucht (4.4.1 ff), wobei das Hauptaugenmerk auf der strukturellen Voraussetzung sowie der Quantifizierung der Addukte gerichtet wurde. Welche Nachweisgrenzen waren für ausgewählte Adduktverbindungen erreichbar? Wofür könnte die Adduktbildung und Messung der korrespondierenden Säureanionen verwendet werden?

Zu diesem Kapitel wurde die Koordinationskomplexierung hinzugefügt, in der geklärt wurde, inwieweit eine Komplexierung für ausgewählte Substanzklassen möglich ist. Auch war es wichtig zu klären, welche strukturelle Voraussetzungen gegeben sein mussten. Welche Vor- und Nachteile ergaben sich durch die Koordinationskomplexierung?

Im anschließendem Schritt wurden Photoabbauprodukte ausgewählter Sulfonylharnstoffherbizide genauer betrachtet (4.4.2 ff), wobei Wert auf die strukturelle Identifizierung der Metabolite (auch mithilfe der collisionsinduzierten Fragmentierung) gelegt wurde. Welche Anwendung war durch Kenntnis der Metabolite möglich?

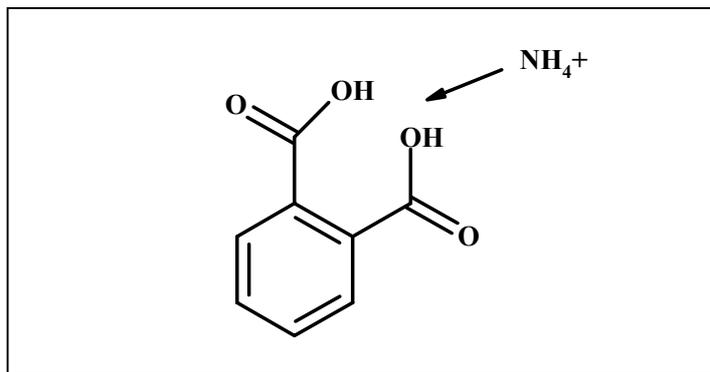
Im letzten Schritt der Anwendung wurden ausgewählte Homoserinlactone in der CE-ESI-MS näher betrachtet, um zunächst qualitativ charakteristische Fragmente herauszufiltern, die später bei Realprobenmessungen eine eindeutige Identifizierung und somit Unterscheidung der Homoserinlactone von anderen Substanzen ermöglichen. Quantitativ wurden die Nachweisgrenzen auf Basis der optimierten CE-ESI-MS-Parameter bestimmt. Welche Möglichkeiten ergaben sich dadurch?

#### 4.4.1 CZE-ESI-MS-Messungen von Adduktverbindungen

##### 4.4.1.1 Bildung von Ammoniumaddukten - strukturelle Voraussetzungen

Organische Carbonsäuren liegen aufgrund ihrer Struktur bei hohem pH-Wert als Anionen vor und können im Negativmodus als negative Quasimolekülonen  $[M-H]^-$  im ESI-MS detektiert werden. Im allgemeinen wird die Temperatur der heated capillary auf 170 °C eingestellt.

Phthalsäure zeigte ein besonderes Verhalten. Es war im Negativmodus als Anion und im Positivmodus durch Anlagerung von Ammonium (aus Ammoniumcarbonat, pH 10.3) als positives Quasimolekülion  $[M+H]^+$  nachweisbar (Abb. 43).



**Abb. 43:** Bildung des Ammoniumaddukts durch Anlagerung von Ammonium an Phthalsäure

Die Temperatur der heated capillary wurde zu Anfang auf 70 °C eingestellt (high pressure Messungen). Für die CZE-ESI-MS-Messungen wurde die Temperatur auf 100 °C justiert, um ein Eindringen von Wasser ins MS zu vermeiden. Die sheath liquid mußte Ammoniumionen enthalten, um eine Ausbildung des Adduktes gewährleisten zu können (Methanol/Wasser/Ammoniak: 50/49/1 bzw. für CZE-ESI-MS-Messungen: 50/45/5).

Welche organischen Carbonsäuren und andere Substanzen waren in der Lage, mit Ammonium ein Ammoniumaddukt zu bilden? Die Abbildung 44 und Tabelle 22 geben Aufschluss darüber, welche strukturelle Voraussetzungen notwendig waren.

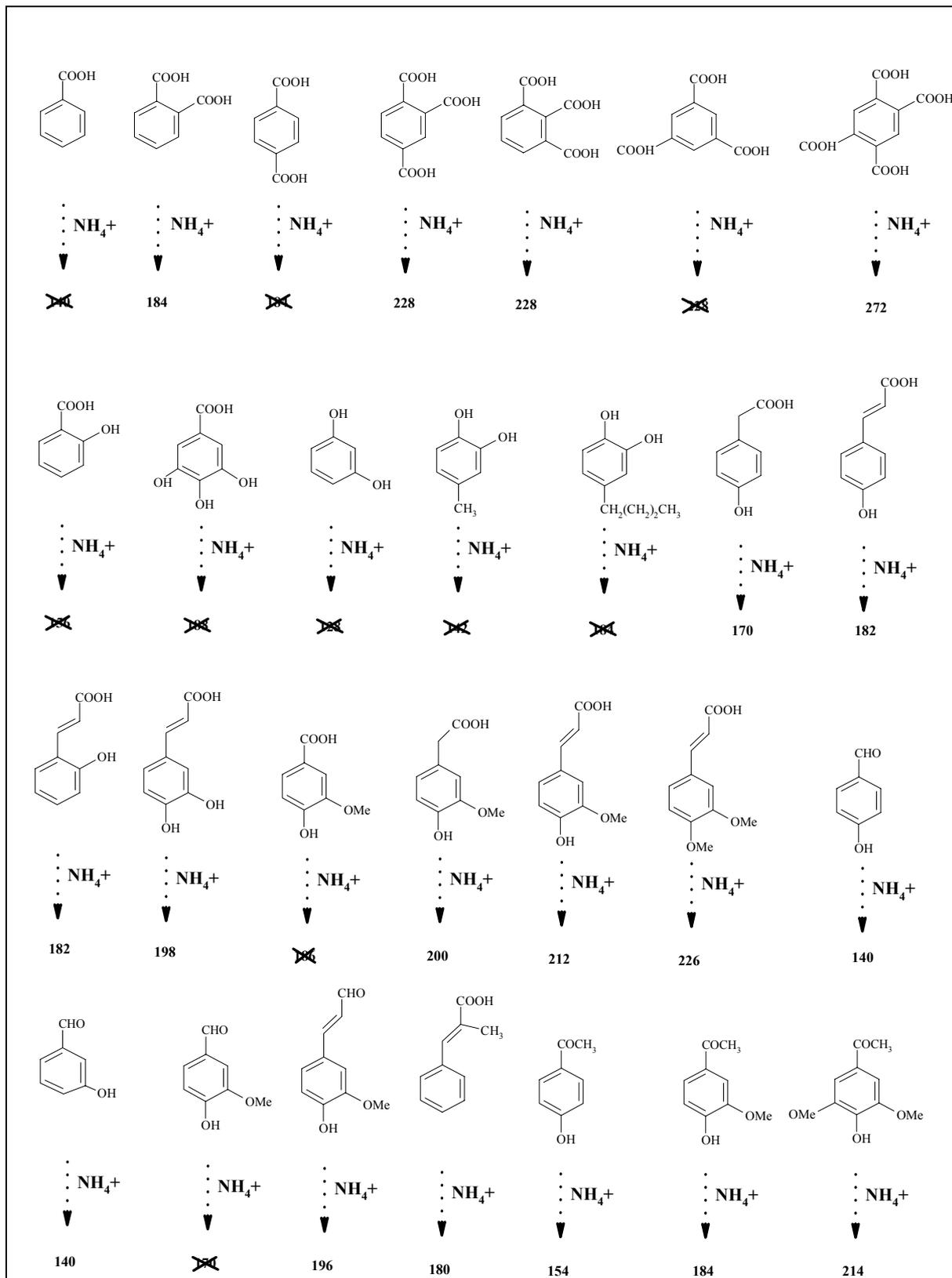
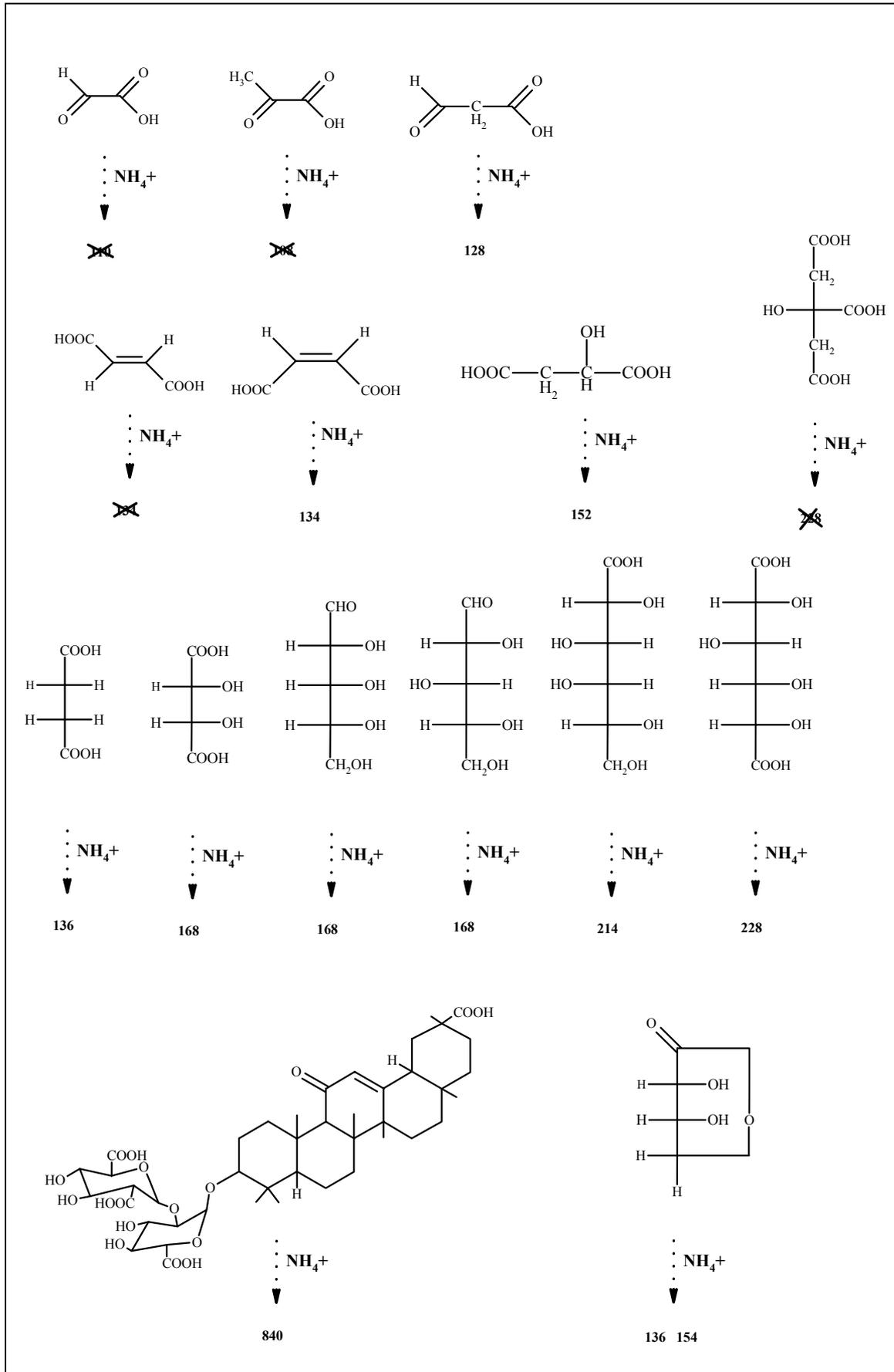


Abb. 44: strukturelle Voraussetzungen für die Bildung des Ammoniumaddukts (org. Carbonsäuren)



**Abb. 44 (Fortsetzung):** strukturelle Voraussetzungen für die Bildung des Ammoniumaddukts (Monosaccharide, Glycyrrhizinsäure m/z Addukt: 840)

„Klasse“	Strukturelle Einheit notwendig für Adduktbildung	An welcher Position in Tabelle 44 zu finden?
Mehrfach substituierte Carbonsäuren	Zwei Carboxygruppen in räumlicher Nähe	Reihe 1, S. 122
Hydroxycarbonsäuren Hydroxyphenole Alkylphenole Methoxy(hydroxo)-allylcarbonsäuren Hydroxybenzaldehyd	Kontakt von Carboxygruppe mit Hydroxygruppe; nicht möglich, wenn: Carboxygruppe nicht „beweglich“	Reihe 2,3, S. 122
(Methoxy)hydroxo-(allyl)benzaldehyd Methoxyhydroxobenzomethylester	Kontakt von Carboxygruppe mit Hydroxygruppe, sogar möglich, wenn: Methoxygruppe räumliche Trennung bewirkte nicht möglich, wenn: Carboxygruppe nicht „beweglich“	Reihe 4, S. 122
Alkylsäuren	Zwei Carboxygruppen mindestens durch eine Methylengruppe getrennt, trans-Konfigurierung: keine Adduktbildung	Reihe 1,2, S. 123
Monosaccharide: C2- C4	Alle Zucker zeigten Adduktbildung	Reihe 3, S. 123
Diglukuronid der 18 $\beta$ -Glycyrrhezinsäure	Deutliche Ausbildung des Adduktes	Reihe 4, S. 123
Zuckerlacton	zwei Addukte, eines des offenen und eines des „geschlossenen“ Moleküls	Reihe 4, S. 123

**Tab. 22:** Strukturelle Voraussetzung für die Ausbildung eines Ammoniumaddukts

#### 4.4.1.2 Messung der phenolischen Säuren als positives Addukt und als korrespondierendes Säureanion

Aus der Vielzahl der untersuchten Substanzen (Abb. 44) wurden Phthalsäure ( $m/z = 165$ ), 1,2,4-Benzentri- und 1,2,4,5-Benzentetracarbonsäure ( $m/z = 209$  und  $253$ ) in CZE-ESI-MS im Positivmodus bei  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  untersucht. Die Addukte  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  waren  $m/z = 184$ ,  $228$  und  $272$ .

Zu Beginn der CZE-ESI-MS-Messungen mußte der Abstand ESI-Nadel zu heated capillary optimiert werden, da für die Addukte eine Distanz von  $5\text{ mm}$  nicht ausreichte (vgl. Kap. 4.3.8). Es kristallisierte sich ein Abstand von  $7.1\text{ mm}$  heraus, bei dem S/N-Werte und Peakintensitäten für die Ammoniumaddukte akzeptabel waren (zwischen ca.  $5$  und  $16$ , ohne Abb.).

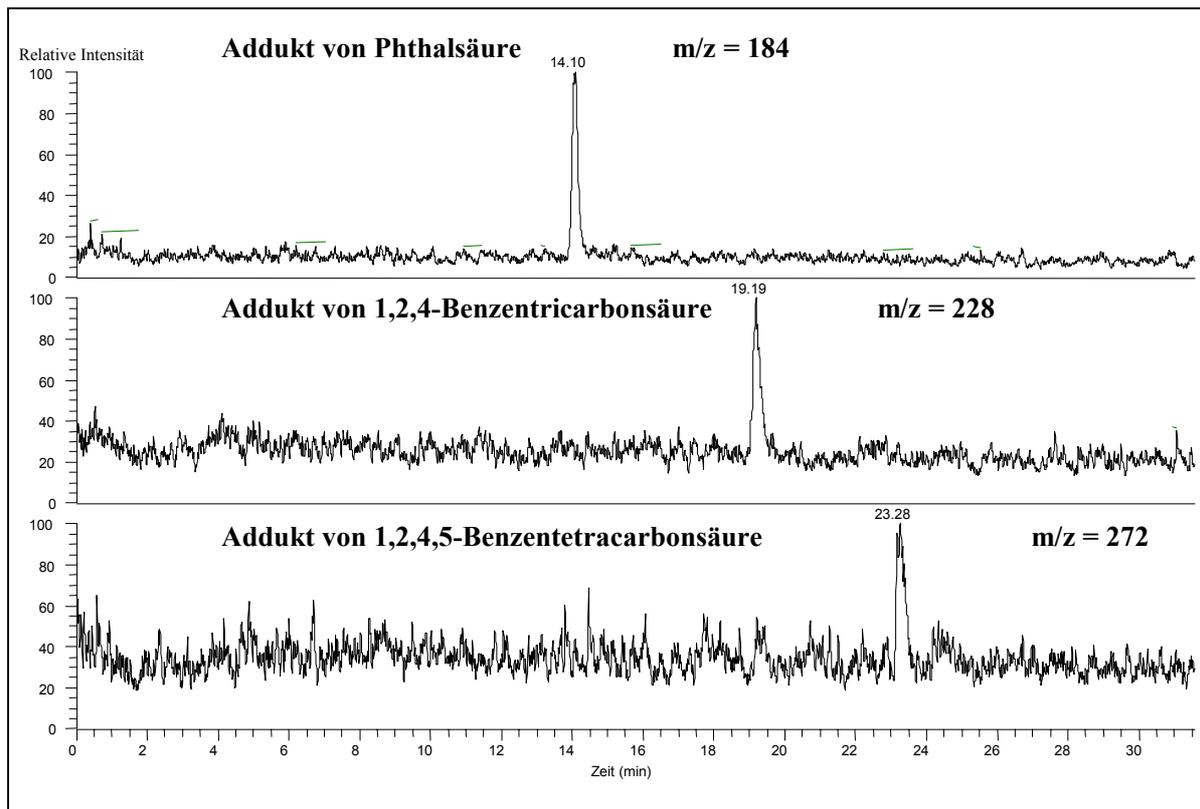
Unter  $10\text{ mM}$  Pufferkonzentration fiel auf, dass zwar die Intensität des Phthalsäure-Addukts anstieg, aber die Intensität der zweifach und dreifach substituierten Carbonsäure abfiel. Bei  $20\text{ mM}$  wurden im Einklang mit dem Signal-Rauschverhältnisses akzeptable Peakintensitäten erhalten. Oberhalb  $20\text{ mM}$  verschlechterte sich die Peakintensität und das Signal-Rauschverhältnis. Deshalb wurde mit einem  $20\text{ mM}$  Puffer gemessen (Abb. 45)

Mit diesem Puffer wurde eine Quantifizierung der drei Adduktverbindungen im SIM-Modus durchgeführt (Tab. 23):

Addukt von	R <sup>2</sup> [n=4]	LOD [ppm]
Phthalsäure	0.9703	9.1
1,2,4-Benzentricarbonsäure	0.9443	15.9
1,2,4,5-Benzentetracarbonsäure	0.8954	28.3

**Tab. 23:** Quantifizierung der Addukte im SIM-Modus; CE-ESI-MS-Bedingungen: siehe Abbildung..

Wie aus Tabelle 23 hervorging, waren die gemessenen Nachweisgrenzen für die untersuchten Adduktverbindungen ( $S/N = 3$ ) zwischen  $9.1$  und  $28.3\text{ ppm}$ .

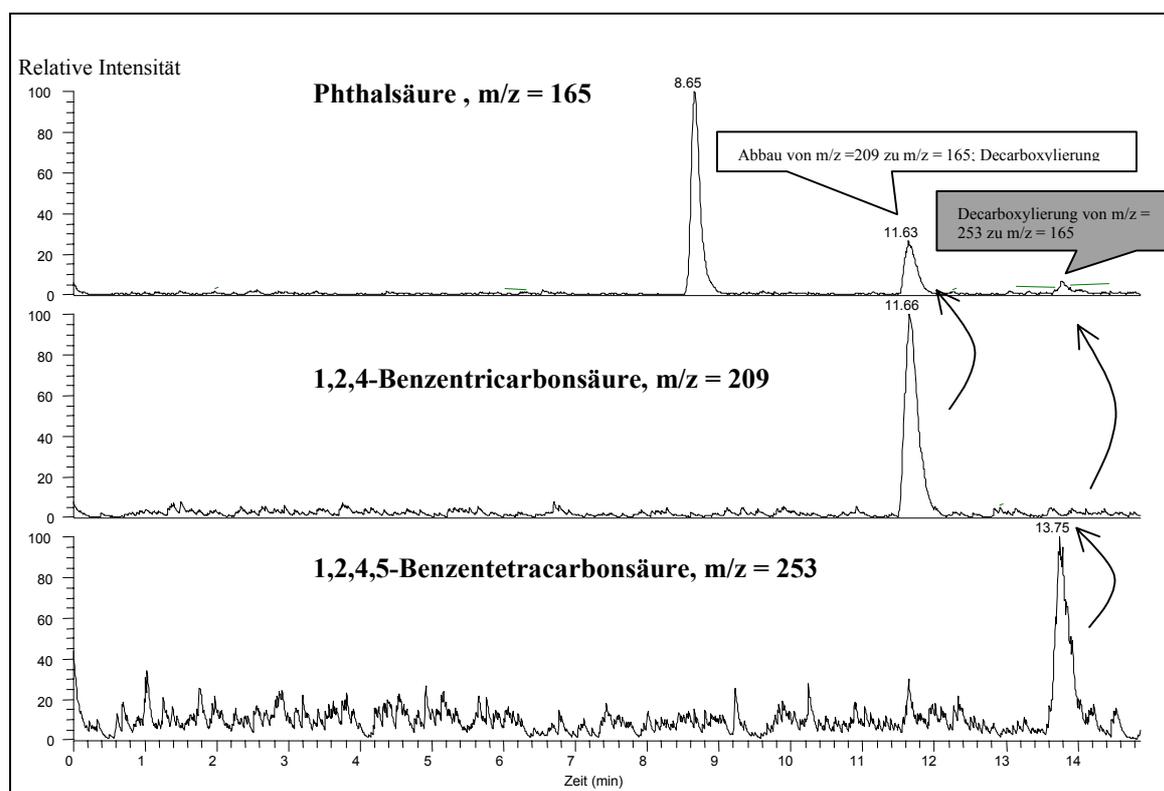


**Abb. 45:** Ausbildung des Ammoniumaddukts unter Verwendung von 20 mM Pufferkonzentration  $m/z = 184$  (Phthalsäure-Addukt),  $m/z = 228$  (1,2,4-Benzentricarbonsäure-Addukt) und  $m/z = 272$  (1,2,4,5-Benzentetracarbonsäure-Addukt). CE-Bedingungen: Konzentrationen der Analyten: 50 ppm, 50-40-360-360 Kapillaren (58 cm bzw. 24 cm) über „Zero-dead-volume-Union“ gekoppelt, 10 mM Ammoniumcarbonatpuffer, pH 10.1, 15 sec. Inj., 30 kV + low pressure; ESI-MS-Bedingungen: heated capillary: 100 °C, ESI-kV: 5.4 , sheath gas: 0 arb, sheath liquid: Methanol/Wasser/Ammoniak/50/45/5L:1 $\mu$ l/min, Abstand ESI-needle zu heated capillary: 7.1 mm

Es fielen die hohen Nachweisgrenzen der Adduktverbindungen auf, wobei in der Reihe Phthalsäure zu 1,2,4,5-Benzentetracarbonsäure die Nachweisgrenzen anstiegen. Obwohl die Messung im SIM-Modus erfolgte, war keine deutliche Reduzierung der Nachweisgrenzen zu erkennen.

Für eine quantitative Analytik waren diese Konzentrationen unbrauchbar, da stets darauf geachtet werden musste, dass die Konzentrationen der untersuchten Adduktverbindungen ausreichend genug waren, um eine Aussage über die Bildung des Addukts machen zu können.

Für die Messungen der korrespondierenden Säureanionen im Negativmodus  $[M-H]^-$  wurde keine gekoppelte Kapillaren, sondern eine 77 cm 50  $\mu\text{m}$  I.D. Kapillare eingesetzt. Bei einem Abstand von 3.7 mm und einer ESI-Spannung von 3.6 kV konnten eindeutige Signale erhalten werden (Abb. 46).



**Abb. 46:** Bestimmung der korrespondierenden Anionen im Negativmodus  $[M-H]$  von Phthalsäure, 1,2,4-Benzentricarbonsäure und 1,2,4,5-Benzenetetracarbonsäure. CE-Bedingungen: Konzentrationen der Analyten: 50 ppm, 20 mM Ammoniumcarbonatpuffer, pH 10.1, 25 kV, 20 sec Inj, 77 cm (50  $\mu\text{m}$  I.D.) - Kapillare ; ESI-MS-Bedingungen: sheath gas 25 arb, ESI-kV: 3.6, Abstand (ESI-needle zu heated capillary): 3.7 mm sheath liquid: Methanol/Wasser/Ammoniak: 50/45/5 @ 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Unter den gegebenen Elektrospraybedingungen erfolgte eine Decarboxylierung der höher substituierten Carbonsäuren zur zweifach substituierten Phthalsäure. Eine weitere Decarboxylierung zur einfach substituierten Benzoesäure ( $m/z = 121$ ) wäre wahrscheinlich. Jedoch wurde Benzoesäure nicht zur Messung herangezogen.

Bei Vergleich der Addukte  $[M+NH_4]^+$  (Abb. 45) und der korrespondierenden Säureanionen  $[M-H]^-$  (Abb. 46) traten hinsichtlich des Signal-Rausch-Verhältnisses deutliche Unterschiede

auf. Vor allem bei dem Addukt der 1,2,4,5-Benzen-tetracarbonsäure ließ sich ein hoher Hintergrund bei verhältnismäßig kleinem Substanzsignal feststellen.

#### 4.4.1.3 Zusammenfassung und Ausblick

Für die quantitative Analytik wäre deshalb die Messung der Säureanionen als positives Addukt nicht geeignet, da sehr hohe Konzentrationen eingesetzt werden müssten. Sheath gas wurde im Positivmodus nicht gebraucht. Für die qualitative Screening-Analytik zum Herausfinden charakteristischer Substanzmerkmale aus Realproben wäre die Messung im Positivmodus nur dann geeignet, wenn ausreichend hohe Konzentrationen verwendet würden. Die als negative Quasimoleküle gemessenen korrespondierenden Säureanionen wurden zwar detektiert, aber während den Messungen wurde zur Stabilisierung des Elektrosprays ein hoher sheath gas Fluss gebraucht.

Insgesamt gesehen könnte die Messung der Addukte im Positivmodus als auch die der korrespondierenden Säureanionen im Negativmodus zur Screening-Analytik von Verbindungen durchgeführt werden, die leicht Addukte mit Ammonium bilden. Somit wäre ein direkter Vergleich der Addukte und der Anionen möglich. Zusätzlich müsste auf eine ausreichend hohe Konzentration der Analyten geachtet werden.

### 4.4.2 Koordinations-Ionenspray-Massenspektrometrie von ausgewählten Substanzen

#### 4.4.2.1 Voraussetzungen

Diese von Prof. Bayer [Bayer et al., 1999] entwickelte Methode nutzt die Bildung von positiv oder negativ geladenen Koordinationsverbindungen ( $\pi$ -Komplexe) durch Zugabe eines geeigneten Zentralatoms zur Sheath liquid aus. Im Gegensatz zu den in 4.4.1 f. dargestellten Addukte werden bei der Koordinationskomplexierung keine Ionen an entsprechende Gruppen „angelagert“, sondern es entstehen Komplexe unter Zuhilfenahme des  $\pi$ -Elektronensystems.

Mit Metallen der ersten und achten Nebengruppe des Periodensystems, z.B.  $\text{Cu}^I$ ,  $\text{Ni}^{II}$ ,  $\text{Pd}^{II}$ ,  $\text{Pt}$  und  $\text{Ag}^I$  bilden ungesättigte Verbindungen sehr stabile  $\pi$ - oder  $\pi$ -Allylkomplexe [Bayer et al., 1999]



Reagenz	Lösungsmittel	Analyte
$\text{H}_3\text{BO}_3$	Wasser, Alkohol	Zucker, Polysaccharide, Alkohole
$\text{AgNO}_3$	Wasser, Alkohol, Acetonitril (NACE!)	Ungesättigte Komponenten: aromatisch oder langkettig (Carotinoide); s-Triazine?
<b>Metalle der ersten und achten Nebengr. des PSE</b> ( $\text{Cu}^I$ , $\text{Ni}^{II}$ , $\text{Pd}^{II}$ (s. unten), $\text{Pt}$ und $\text{Ag}^I$ (s.o.))	s.u ; s.o.	s.u ; s.o.
$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	Wasser, Alkohol, Acetonitril (NACE!)	Glykoalkaloide, s-Triazine?

**Tab. 24:** Vorüberlegung zur möglichen Ausbildung von CIS-Komplexen für zu untersuchende Substanzen [nach Bayer et al., 1999]

#### 4.4.2.2 Flow injection Messungen für Substanzen mit Tendenz zur Ausbildung von $\pi$ - Komplexen

Im Gegensatz zu Messungen von Substanzen in ESI-MS ist in CIS-MS kein elektrisches Feld (d.h. ESI-Spannung) zur Ausbildung von Komplexen notwendig. Eine effektive Vernebelung der aus der CE-Kapillare und aus dem Sheath liquid-Kanal (enthält Komplexierungsagens) austretenden Flüssigkeit ist jedoch erforderlich. Zur Stabilisierung des Vernebelungsprozesses wurde häufig eine unterstützende ESI-Spannung angelegt. CIS-MS kann sowohl im positiven als auch negativen Modus in Abhängigkeit vom Zentralatom der Komplexierungslösung angewendet werden [Bayer et al., 1999].

Für die CIS-MS-Messung eines s-Triazin-(Desethylatrazin)-, eines Phenylharnstoffherbizids (Monuron) und eines Homoserinlactons (OHL, vgl. Abschnitt 4.4.2.2 f) wurden flow injections durchgeführt, indem die von der CE kommende Flüssigkeit mit 20 psi (= high pressure) ins ESI-MS gepumpt wurde. Als Komplexierungsagens wurde Silbernitrat eingesetzt, da es mit aromatischen Systemen  $\pi$  - Komplexe bildete. Für Desethylatrazin und Monuron sollte

demnach eine Komplexierung möglich sein. Ob OHL mit Silbernitrat komplexierte, war zu Beginn der Untersuchungen noch nicht klar.

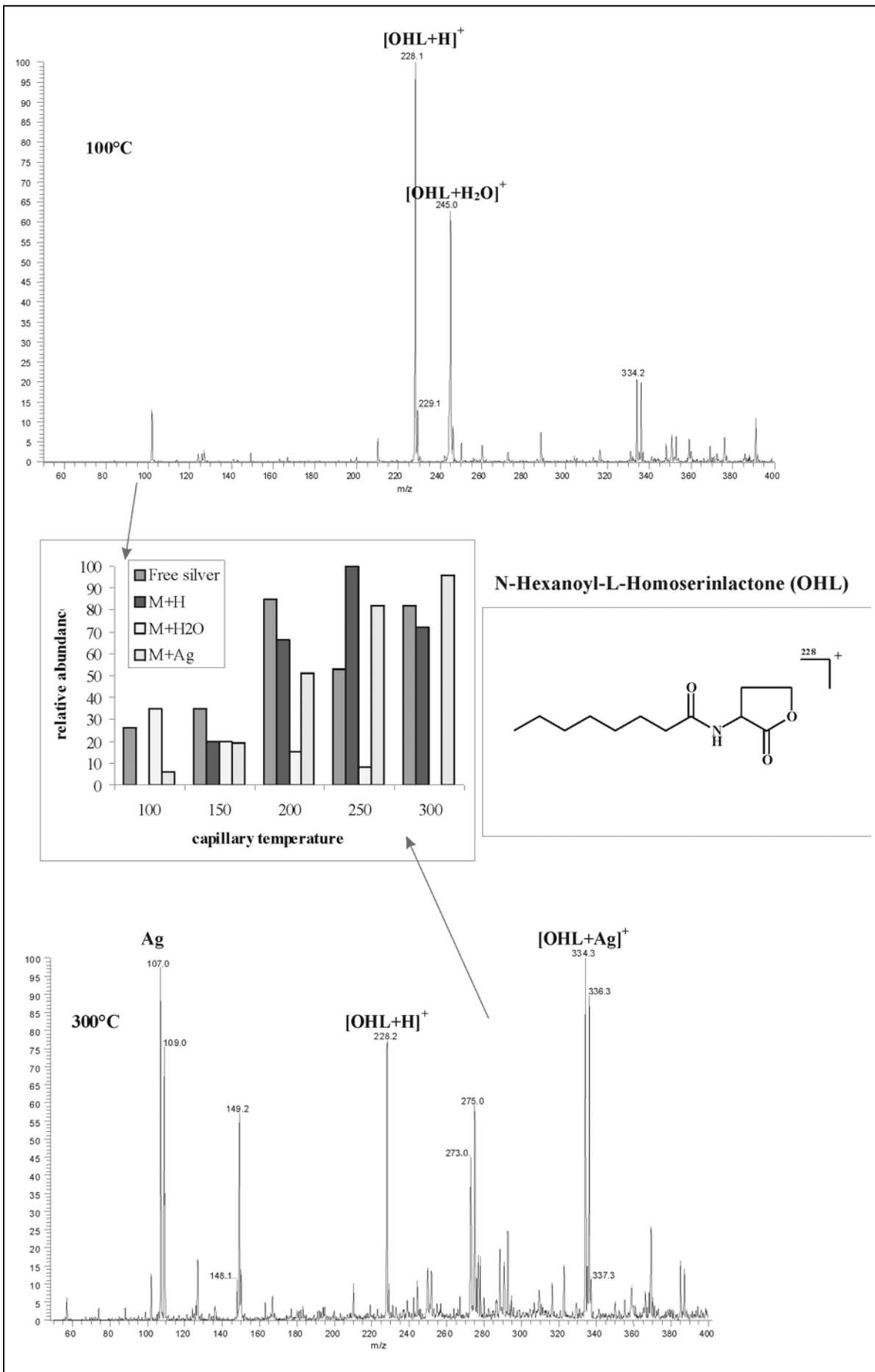
Um einen exakten Überblick über den Einfluß der Temperatur auf die Ausbildung der Komplexe zu bekommen, wurde für die Substanzen je eine Temperaturreihe von 100 °C bis 250 °C bzw. 300 °C in 50 °C - Schritten durchgeführt. Zur Erklärung der Haupteinflüsse wurde das Minimum (100°C) und das Maximum (250 und 300 °C) ausgewählt.

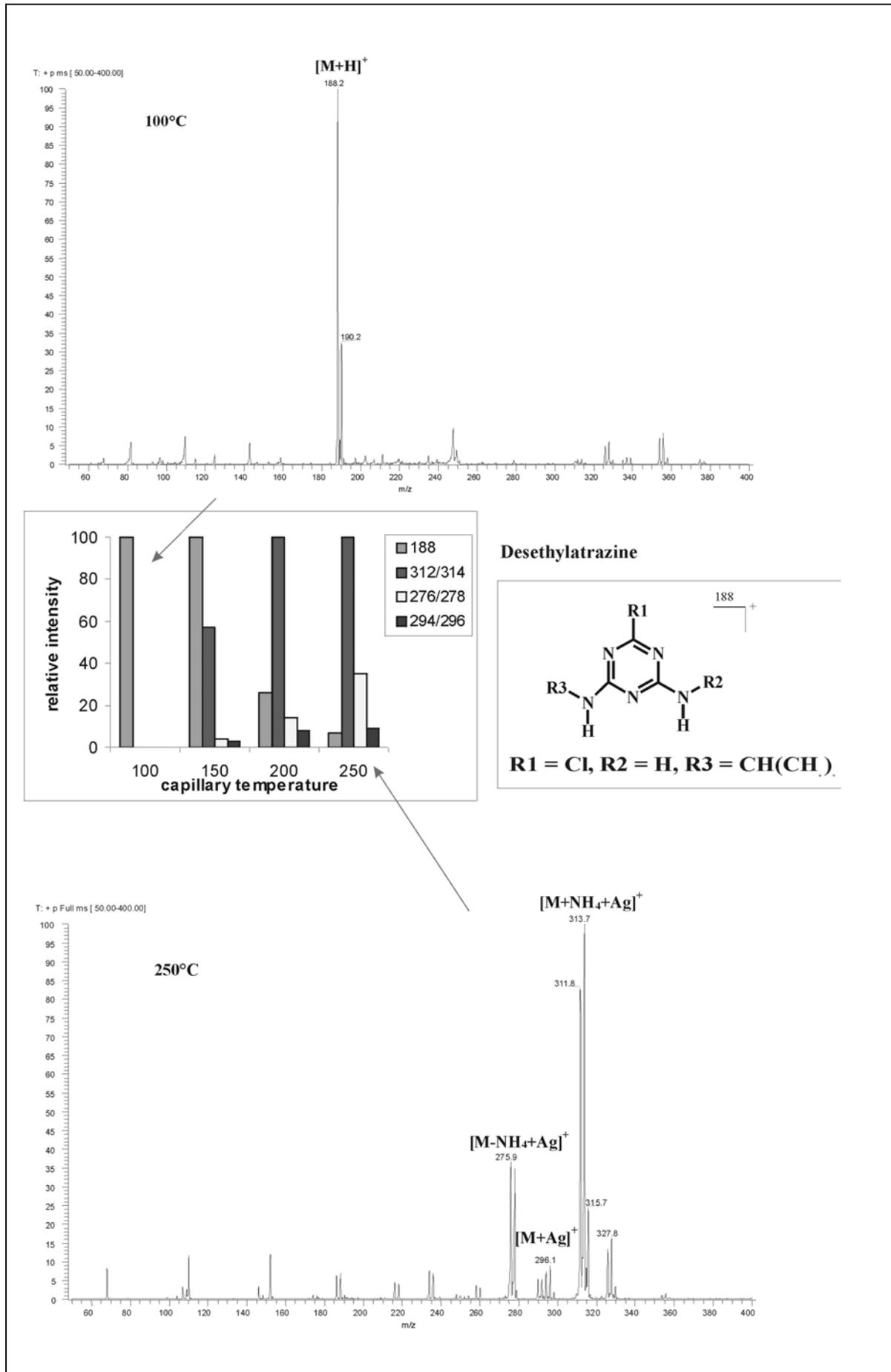
Bei Vergleich der Ergebnisse von OHL und Monuron (Abb. 48 a,c) bei niedrigster gemessener Temperatur (100°C) traten „Wassercluster“ mit dem zugehörigen Molekularion auf  $[M+H_2O]$ . Bei der höchsten Temperatur (250 bzw. 300°C) reduzierte sich die Intensität des Wassercluster deutlich und die Formation mit dem Silberion war dominierend  $[M+Ag]^+$  bzw.  $[M+H_2O+Ag]^+$ .

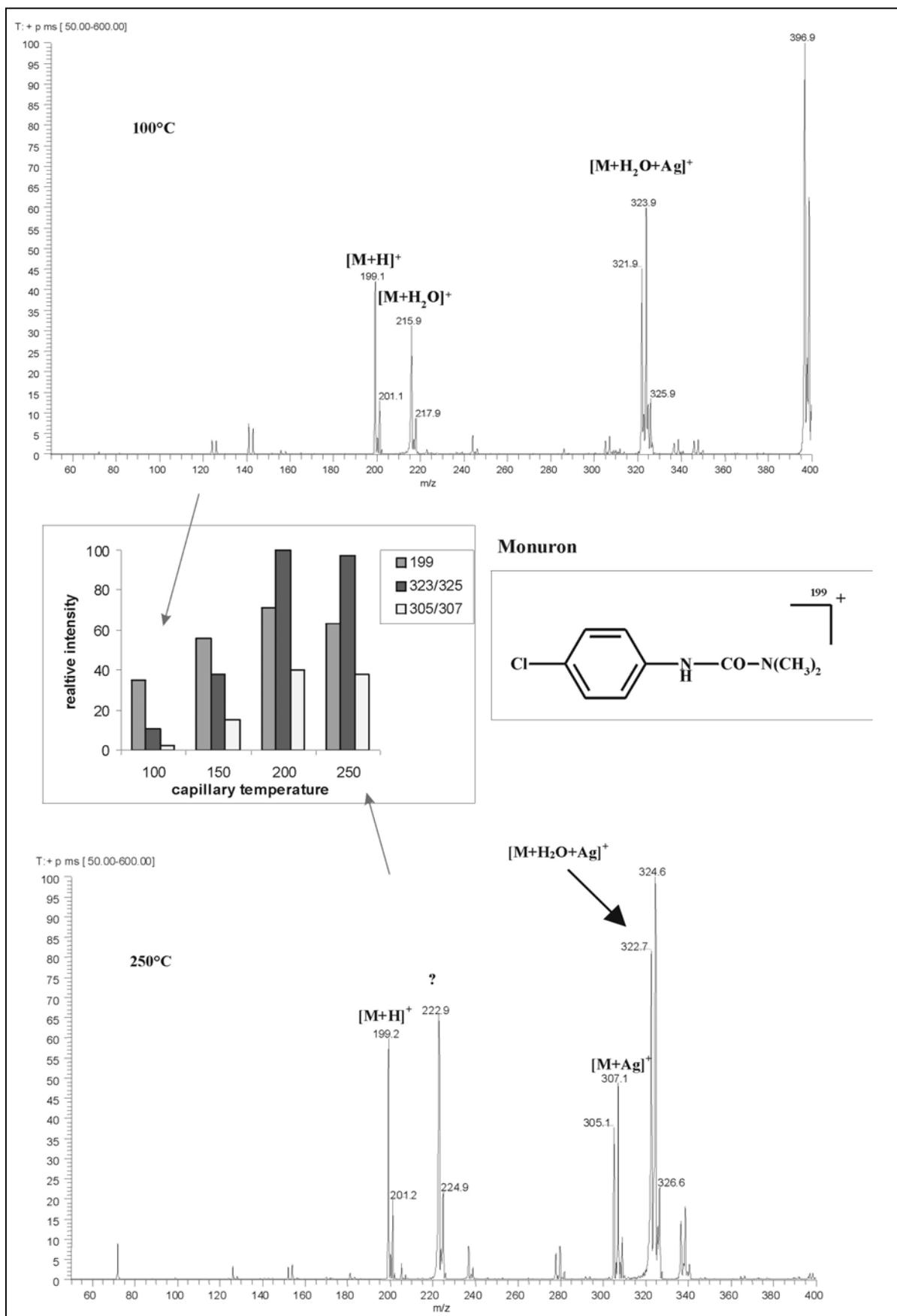
Monuron zeigte bei 100 °C im Gegensatz zu OHL eine Anlagerung von Wasser unter gleichzeitiger Komplexierung mit Silber  $[M+H_2O+Ag]^+$ .

Mit zunehmender Temperatur der heated capillary konnte eine Erhöhung an „freien“ Silberionen ( $^{107}Ag$  und  $^{109}Ag$ ) im „Elektrospray“ bei OHL beobachtet werden. Bei niedrigster Temperatur lag kein oder nur wenig freies Silber vor, was zu keiner Komplexierung des Molekularions mit Silber führte (Abb. 48 a, OHL). OHL besaß kein aromatisches System, so daß die Komplexierung mit hoher Wahrscheinlichkeit mit dem Sauerstoffatom der Carbonylgruppe stattfand.

Aufgrund des verstärkten Komplexierungsverhaltens von Desethyltriazin und Monuron konnte man bei 250 °C kein freies Silber mehr beobachten, da der Hauptanteil zur Komplexierung herangezogen wurde.







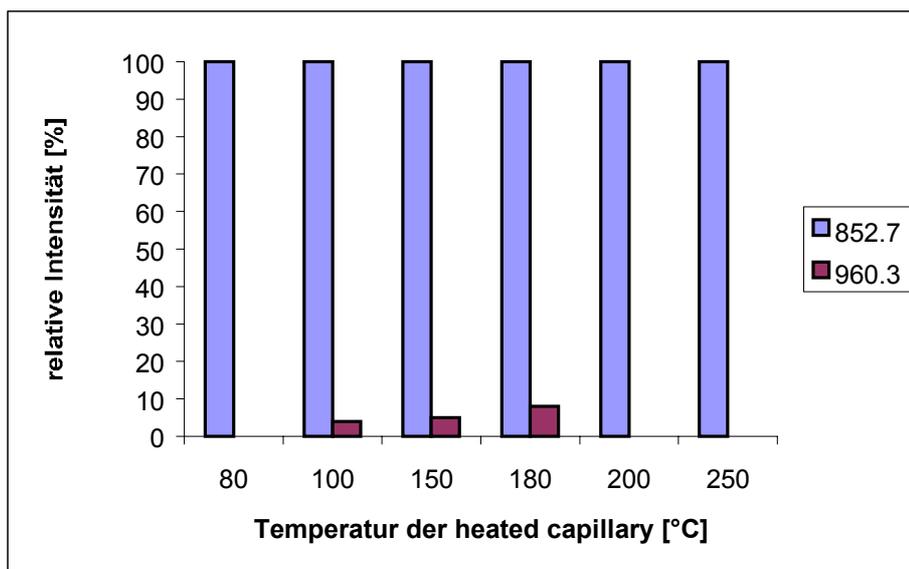
**Abb. 48:** Komplexierung von OHL (a), Desethyltriazin (b) und Monuron (c) mit Silbernitrat. **CE-Bedingungen:** high pressure, Konzentrationen der Analyten: ca. 25 ppm; Puffer: Acetonitril/Methanol 90/10 in 50 mM Ammoniumacetat und 1.2 M Essigsäure. **ESI-MS-Bedingungen:** ESI-Spannung: 1.5 kV, Abstand ESI-needle zu heated capillary: 2.9 mm, sheath gas: 30 arb, auxiliary gas: 20 arb

Für eine effiziente Komplexierung mußte die Temperatur der heated capillary auf 250 bzw. 300 °C eingestellt werden. In diesem Falle wurde ein Standard-Sheath-Liquid-Gemisch verwendet: Methanol/Wasser/**Essigsäure**: 50/49/1 + 60 µg/ml Silbernitrat: 12.5 µl/min.

Für die Komplexierung von Desethylatrazin (Abb. 48 b) wurde eine andere Sheath liquid eingesetzt: Methanol/Wasser/ 50/50 + **2% Ammoniak** + 60 µg/ml Silbernitrat: 12.5 µl/min. In diesem Fall war bei 100 °C kein Wassercluster zu sehen, während dagegen mit zunehmender Temperatur bis 250 °C der Silberkomplex mit einer gleichzeitigen Ammoniumanlagerung detektiert werden konnte  $[M+Ag+NH_4]^+$ , der zugleich den Komplex mit der größten relativen Intensität darstellte.  $[M+Ag]^+$  war verschwindend gering (ca. 10%).

#### **4.4.2.3 Flow injection Messungen für Substanzen mit geringer Tendenz zur Ausbildung von Koordinationskomplexen**

Zur Testung der Komplexbildung mit Silbernitrat wurde das Glykoalkaloid  $\alpha$  - Chaconin (Struktur vgl. 4.3.5.3) herangezogen. Unter Verwendung einer Sheath liquid mit Methanol/Wasser 50/50 + 1% Essigsäure + 67 µg/ml Silbernitrat: 12.5 µl/min zeigte sich im wesentlichen von 100 bis 250 °C nur der Molekularpeak  $[M+H]^+$   $m/z = 852$ . Der Komplex  $[M+Ag+H]^+$   $m/z 960$  war mit einer Intensität von ca. 10 % sehr gering (Abb. 49). Aufgrund der isolierten Doppelbindung des  $\alpha$  - Chaconin-Moleküls wäre eine Komplexierung zu erwarten, jedoch war die Ausbildung des  $\pi$  - Komplexes von sehr geringer Intensität.



**Abb. 49:** CIS-MS von  $\alpha$  - Chaconin; CE und ESI-Bedingungen: siehe Abb. 46;  $(m/z) = 852.7 : [M+H]^+$ ,  $(m/z) = 960 [M+Ag+H]^+$ .

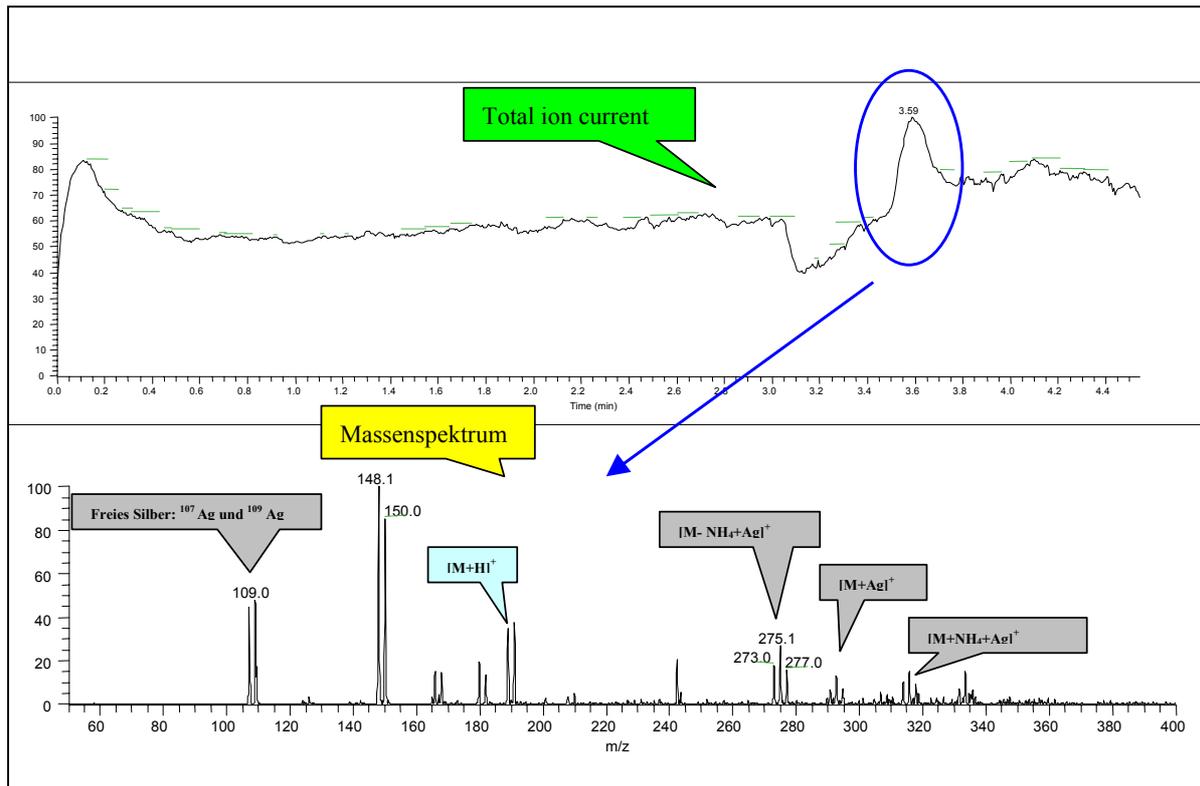
Für  $\alpha$  - Chaconin war Silbernitrat kein geeignetes Komplexbildungsmittel. Andere versuchten Komplexbildungsmittel waren  $B^{II}$ -Komplexe (wie  $Na_2B_4O_7$  oder  $H_3BO_3$ ). Jedoch konnte keine deutliche Komplexbildung, auch während der Änderung der Temperatur der heated capillary, festgestellt werden.

Palladium (II) acetat wurde nicht in CIS-MS verwendet, da die hergestellte Lösung schon nach kurzer Zeit ausflockte.

#### 4.4.2.4 CIS-MS-Lauf mit Desethylatrazin als EOF-Marker

Um der Frage nachzugehen, wie stark die Komplexbildung unter dem Einfluß von Hochspannung stattfand, wurde anhand von dem s-Triazin-Herbizid Desethylatrazin ein CE-ESI-MS-Lauf im CIS-MS-Modus durchgeführt.

Es wurde ein wässriger Ammoniumacetatpuffer (10 mM, pH 6.8) ausgewählt, als sheath liquid kam Methanol/Wasser/ 50/50 + 2% Ammoniak + 60  $\mu$ g/ml Silbernitrat: 12.5  $\mu$ l/min zum Einsatz (Abb. 50).



**Abb. 50:** CIS-MS-Lauf von Desethylatrazin unter Verwendung eines 10 mM Ammoniumacetat-Puffers, pH 6.8. **CE-Bedingungen:** 30 kV, 15 sec Injektion, Probenkonzentration: 20 ppm; **ESI-MS-Bedingungen:** 1.5 ESI-kV, sheath gas: 30 arb, aux. Gas: 20 arb, Abstand ESI-needle zu heated capillary: 2.9 mm, Temperatur der heated capillary: 250°C ; Anmerkung m/z = 148 bzw. 150 konnten nicht zugeordnet werden; Desethylatrazin lag bei pH 6.8 neutral vor, so daß es mit der Geschwindigkeit des EOF wanderte.

Die zu erwartenden Silber-( $^{107}\text{Ag}$  und  $^{109}\text{Ag}$ ) - Komplexe  $[\text{M}+\text{Ag}]^+$ ,  $[\text{M}-\text{NH}_4+\text{Ag}]^+$  und  $[\text{M}+\text{NH}_4+\text{Ag}]^+$  traten zwar im Massenspektrum auf, aber nur mit geringer Intensität als im Vergleich zu den flow injection-Messungen.

Auffallend war, daß im Massenspektrum die Silberisotope  $^{107}\text{Ag}$  und  $^{109}\text{Ag}$  detektiert werden konnten, was im Falle der high pressure Messungen nicht der Fall war (vgl. Abb. 48). Deshalb wurde vermutet, daß nicht eine vollständige Komplexierung des Molekularions mit den Silberisotopen stattfand.

#### 4.4.2.5 Zusammenfassung und Ausblick

Mit der Koordinationskomplexierung konnte gezeigt werden, dass OHL, Desethylatrazin und Monuron bei erhöhter Temperatur der heated capillary  $\pi$ -Komplexe mit Silberionen bildeten, während  $\alpha$  - Chaconin nicht komplexierte. Demnach war  $\alpha$  - Chaconin für CIS-MS nicht geeignet.

Für Desethylatrazin wurde ein CIS-MS-Lauf unter Anwendung von Hochspannung durchgeführt, wobei ein hoher sheath gas Fluß, aber eine geringe Sprayspannung notwendig waren.

Die Vorteile der Koordinationskomplexierung lagen in der leichten Komplexierbarkeit von aromatischen Systemen ( $\pi$  - Komplexe) mit Silberionen bei erhöhter Temperatur der heated capillary. Dies kann/konnte genutzt werden, um strukturelle (Bindungs)-Informationen von Molekülen zu bekommen.

Die Nachteile der CIS-MS lagen in der Anwendbarkeit. Nicht alle Substanzklassen waren mit ihr bestimmbar. Ein aromatisches  $\pi$  - System mußte vorliegen. Da nicht nur ein Silberkomplex ein und desselben Moleküles entstand, sondern auch Komplexe von verminderter Intensität, war eine quantitative Analyse nur schwer zugänglich. Zudem führte Silber zu einer Kontamination der heated capillary und der Skimmerlinse (vgl. Abschnitt 6.2.2 ff), so dass diese oft gereinigt werden mussten.

### **4.4.3 Bestimmung der Metabolite von drei Sulfonylharnstoffherbiziden nach Behandlung im Suntest (Photoabbau)**

Die Lebensdauer vieler Pestizide in der Umwelt ist hauptsächlich von biotischen- und Adsorptionsprozessen im Boden abhängig [Gennari et al., 1994]. Die Phototoxizität und Persistenz der meisten Sulfonylharnstoffherbizide wird von den Bodeneigenschaften beeinflusst, z.T. vom pH [[www.hortnet.co.nz/publications/nzpps/proceedings/96/\\_202.htm](http://www.hortnet.co.nz/publications/nzpps/proceedings/96/_202.htm)].

Die Halbwertszeit von Triasulfuron ist abhängig von der Bodenart zwischen 47 und 91 Tagen [[www.agrsci.unibo.it/~gdinelli/mioweb/English/abstract/abstract013.htm](http://www.agrsci.unibo.it/~gdinelli/mioweb/English/abstract/abstract013.htm)], von Thifensulfuron beim Abbau am Boden betrug die Halbwertszeit bei natürlichem Sonnenlicht 6-12 Tage [Bahadir et al., 2000]. Deshalb ist die Halbwertszeit ausreichend lang genug, um v.a. Triasulfuron aus dem Boden durch Oberflächenwässer auszuwaschen.

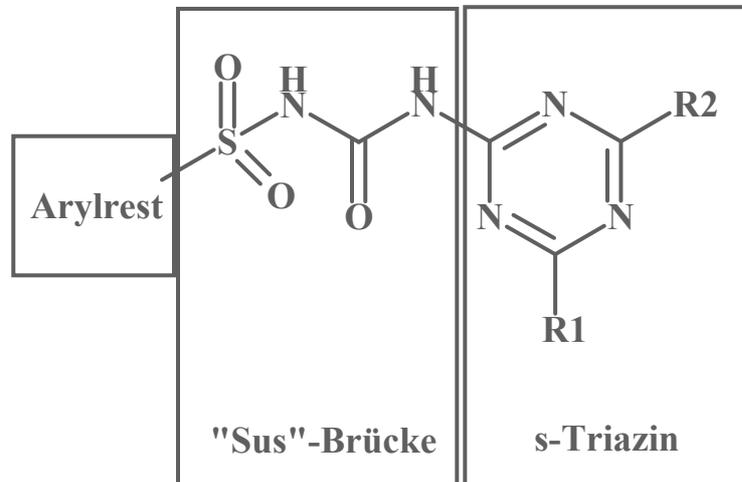
Hydrolyse und Photolyse sind potentielle Prozesse, die an dem Abbau des Pestizids beteiligt sind [Vulliet et al., 2001].

Ziel war es, das photochemische Verhalten nicht nur von Triasulfuron und Thifensulfuron, sondern auch von einem weiteren ausgewählten Sulfonylharnstoffherbizid wie Oxasulfuron mit zu Triasulfuron ähnlicher Struktur unter Berücksichtigung der gebildeten Metabolite in der CE-ESI-MS näher zu charakterisieren.

#### **4.4.3.1 Allgemeine Grundlagen**

In den letzten 10 Jahren wurde eine neue Klasse von Herbiziden, die Sulfonylharnstoffe (Sus) entwickelt [Vulliet et al., 2002]. Die Gründe für eine schnelle Verbreitung in der Anwendung beliefen sich auf eine niedrige Dosiermenge (z.B. für Triasulfuron: 15-30 g aktiver Inhaltsstoff/10000 m<sup>2</sup> [Penmetsa et al., 1997], sehr geringe Tiertoxizität und ein breites Spektrum in der Unkrautbekämpfung [Vulliet et al., 2002].

Prinzipiell kann die Struktur der Sus durch drei wesentliche Bestandteile charakterisiert werden:



**Abb 51:** Aufbau eines Sulfonylharnstoffe: drei Bestandteile: Arylgruppe, „Sus-Brücke“ und s-Triazin, R1, R2 = z.B. Methyl – oder Methoxygruppe

Die drei Hauptwege des Abbaus von Sus in der Umwelt sind chemische Hydrolyse, mikrobieller- und Photoabbau, wobei der zuerst und zuletzt genannte Punkt vorzugsweise pH- und Temperatur- abhängig abläuft [Vulliet et al., 2002].

Zur Simulierung des Photoabbaus wurde der sogenannte Suntest benutzt, mit dem ausgewählte Sulfonylharnstoffe (Oxasulfuron, Triasulfuron und Thifensulfuron) bestrahlt wurden. Nach einer gewissen Zeitspanne wurden Proben entnommen (z.B. nach 2, 4, 8, 10 Stunden). Diese Proben sollten hinsichtlich ihrer Abbaumetabolite untersucht werden.

Zur Analytik kam im ersten Schritt die Kapillarzonenlektrophorese bei hohem und niedrigem pH zum Einsatz, um ein Screening gebildeter Fragmente zu ermöglichen. Im zweiten Schritt wurden diese Fragmente via CE-ESI-MS näher charakterisiert.

#### 4.4.3.2 Tandem-MS-Experimente von Standardsubstanzen

Mittels MS/MS-Experimenten (CID) der Standardsubstanzen war es möglich, erste Aussagen über das Fragmentierungsmuster der drei Analyten machen zu können.

Schon 1992 untersuchte Garcia [Garcia et al., 1992] Sulfonylharnstoffe massenspektrometrisch (ESI) und fand heraus, daß zwei wesentliche Fragmentierungswege auftreten können:

- 1) Spaltung der (Benzyl)sulfonamid-Bindung  
und
- 2)  $\alpha$ -Spaltung der Carbonylgruppe der Harnstofffunktion

Die Sulfonylharnstoff-Standards wurde mittels CID fragmentiert. Dabei sah man eine Fragmentierung vor und nach der Carbonylgruppe des Harnstoffs.

Jedoch konnte die unter Punkt 1 beschriebene Spaltung der (Benzyl)sulfonamid-Bindung nicht nachgewiesen werden, obwohl dabei so verfahren wurde, daß ca. 20 % des Molekularpeaks im Massenspektrum verblieben sind (Thifensulfuron ca. 30%). Es kristallisierte sich heraus, daß die Spaltung vor der Carbonylgruppe bei allen drei Analyten bevorzugt wurde, was sich an dem deutlichen Peak im Massenspektrum äußerte (Abb. 52).

#### **4.4.3.3 CZE-Screening von charakteristischen Fraktionen (und darin enthaltenen Fragmenten) bei zwei unterschiedlichen pH-Werten**

Die im Suntest von Oxasulfuron, Triasulfuron und Thifensulfuron erzeugten Fraktionen wurden mittels CE bei 25 kV auf vorhandene Abbauprodukte untersucht. Aus diesen Messungen kristallisierten sich Hauptfraktionen heraus, die im folgenden aufgeführt sind: Oxasulfuron-Fraktion nach 8 Stunden (Oxa L8), Triasulfuron (Tria L2) und Thifensulfuron (Thif L5).

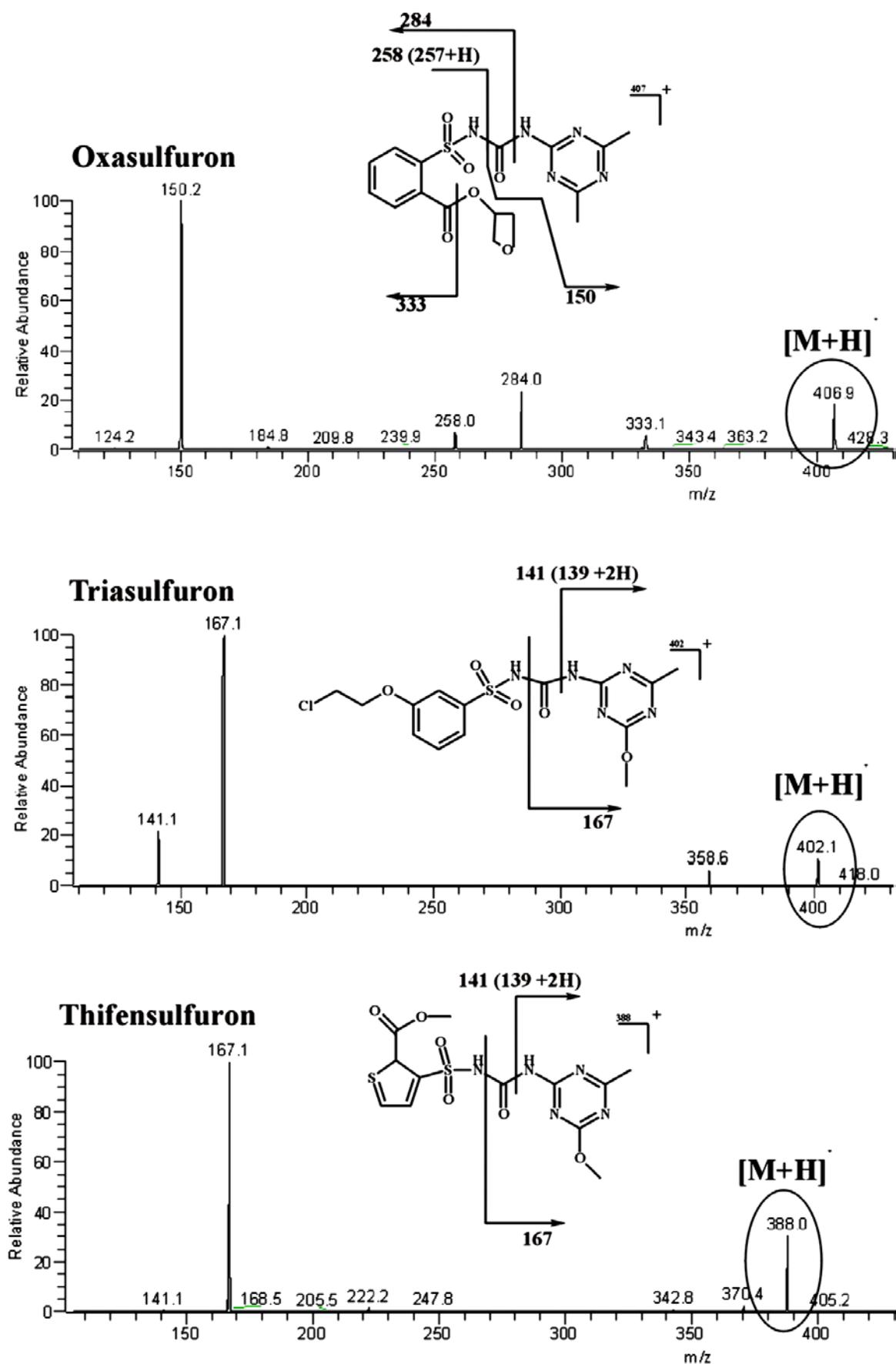
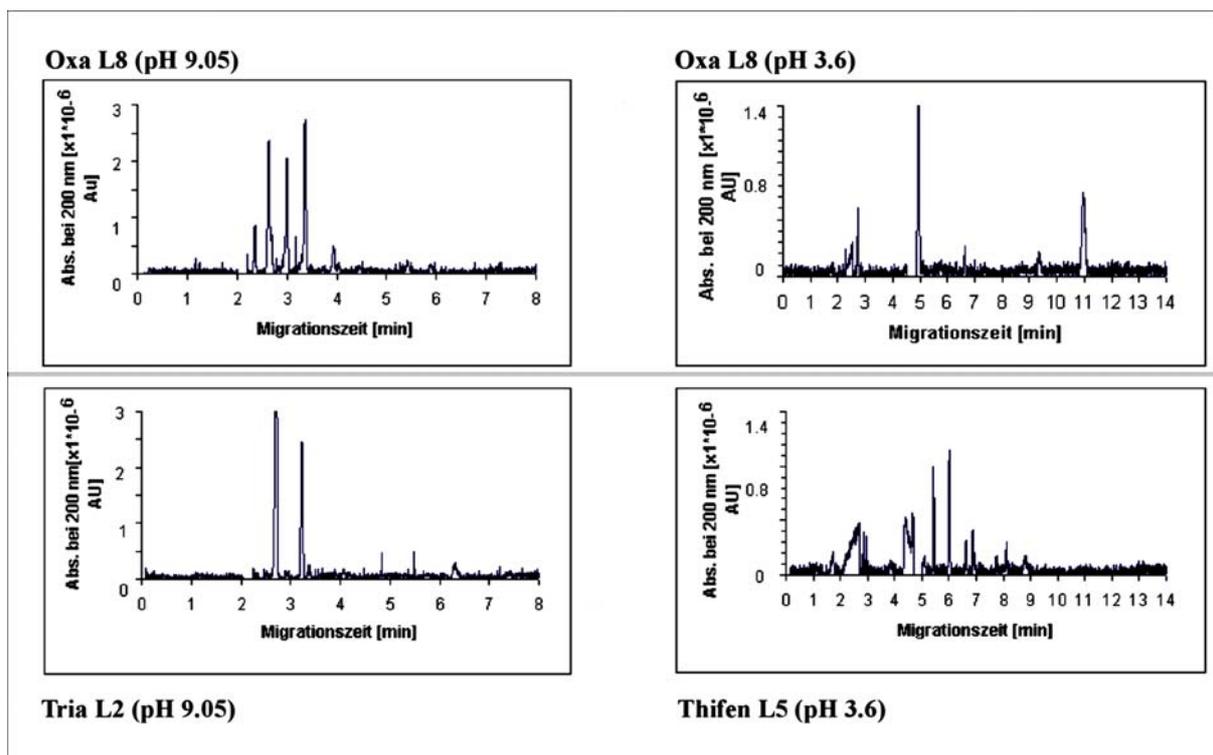


Abb. 52: CID-Massen-Spektrum (CID-Fragmente) von Oxasulfuron, Triasulfuron und Thifensulfuron; high pressure CE-ESI-MS-Messungen

Da protonierbare bzw. saure Gruppen in den Metaboliten vorhanden sein können, wurden ein saurer (pH 3.6) bzw. alkalischer pH (pH 9.05) ausgewählt. In 10 mM Ammoniumacetat, pH 3.6 und 10 mM Ammoniumcarbonat, pH 9.05 wurden die Fraktionen hinsichtlich gebildeter positiv oder negativ geladener Metabolite näher betrachtet.

In Abbildung 53 wird das Ergebnis wiedergegeben.



**Abb. 53:** CZE-Screening von charakteristischen Fraktionen bei pH 9.05 und pH 3.6 [ nach: Laura Scrano, 2002]

Betrachtete man Oxa L8 (pH 9.05) in obiger Abbildung nach dem EOF genauer, so stellte man drei Haupt- (2.6, 3.0, 3.4 min) und 3 Nebenpeaks (2.4, 3.4 und 3.9 min) fest. Bei pH 3.6 wurden vor dem EOF 1 Peak (2.8 min), bei 4.9 min das nicht abgebaute Oxasulfuron und nach dem EOF 2 Peaks, 9.4 (klein) und einen Hauptpeak bei 11 min gefunden.

In Tria L2 (pH 9.05) ließen sich drei Peaks nach dem EOF erkennen (2.7, 3.2, 6.3 (klein)), bei pH 3.6 keine Peaks; dieses Elektropherogramm ist nicht dargestellt.

Bei Thif L5 (pH 3.6) sah man 6 Peaks nach dem EOF, zwei Hauptpeaks bei 5.4 und 6.0 min, kleinere bei 6.6 und 6.9 (6.9 entsprach dem nicht fragmentierten Thifensulfuron) und weitere

bei 8.1 und 8.8 min. Vor dem EOF waren keine Metabolite zu sehen, lediglich die Basislinie veränderte sich zwischen 2 und 3 min stark, was aber keine Substanz darstellte.

Jedoch wurde aus den Elektropherogrammen nicht ersichtlich, welche Metabolite mit ihren zugehörigen Massen entstanden. Hier soll die Elektrospray-Massenspektrometrie wertvolle Hinweise liefern.

#### 4.4.3.4 Identifizierung der entstandenen Photoprodukte mittels CE-ESI-MS

##### 4.4.3.4.1 MS und Tandem-MS

Aus Vorversuchen stellte sich heraus, daß die Konzentration (10 ppm) der unter 4.3.2.3 beschriebenen CE-Trennungen nicht ausreichte, um aussagekräftige Massenspektren zu erhalten. Deshalb wurden die Hauptfraktionen (d.h. nach 10 Stunden für Oxasulfuron und Thifensulfuron und 22 Stunden für Triasulfuron) einer Gefriertrocknung zur Aufkonzentrierung unterworfen. Der trockene Extrakt wurde mit 5 ml destilliertem Wasser rückverdünnt.

Mittels online high pressure MS-Messungen kristallisierten sich folgende in Tab. 25 dargestellten in Lösung vorhandenen Metabolite heraus, die zusätzlich einer energieinduzierten Fragmentierung (CID) unterworfen wurden.

Oxasulfuron Metabolite [m/z]	MS/MS- Fragmente [m/z]	Triasulfuron Metabolite [m/z]	MS/MS- Fragmente [m/z]	Thifensulfuron Metabolite [m/z]	MS/MS- Fragmente [m/z]
167.1 (24%)	150.1, 124.1	184.1 (22%)	141.1	221.5 (28%)	205.0
150.7 (30%)	125.1, 124.3	171.1 (24%)	152.9	189 (26%)	172
124.1 (32%)	107.3	141.1 (32%)	122.8; 100.2	184.1 (22%)	141.1
-	-	127.1 (28%)		141.1 (32%)	100.0, 122.8
-	-	-	-	127.1 (28%)	

**Tab. 25:** Auflistung der im Suntest erhaltenen Fragmente In Klammern: angewandte CID, die notwendig war, um das Fragment weiter fragmentieren zu lassen (runde Klammern); m/z < 100 wurden nicht berücksichtigt; grau hinterlegt: stabile in Lösung vorhandene MS-Fragmente, als [M+H]<sup>+</sup> im ESI nachgewiesen.

Um den Abbau der Stoffe während der Einwirkung im Suntest zu verstehen, wurden näher deren Struktur betrachtet.

Bei den online high pressure CE-MS Messungen von **Oxasulfuron** ließen sich drei stabile, in Lösung vorhandene Metabolite nachweisen. Wie aus Abb. 54 ersichtlich, erfolgte die Bildung des  $m/z = 167$ -Metaboliten durch Spaltung der (Benzyl)sulfonamid-Bindung und Metabolit  $m/z = 151$  und  $124$  durch  $\alpha$ -Spaltung der Carbonylgruppe der Harnstofffunktion. Auffallend war, daß das zuerst und zuletzt genannte Metabolit ionisch (als Kation) in der Lösung vorlag. Dies konnte dadurch gestützt werden, daß weitere mesomere Grenzstrukturen formuliert werden konnten, die einen Aufschluß über die Bildungsstabilität gaben. Wie Lehrbüchern der Organischen Chemie zu entnehmen ist, ist die Wahrscheinlichkeit für die Struktur am höchsten, bei der die meisten Grenzstrukturformeln formuliert werden können.

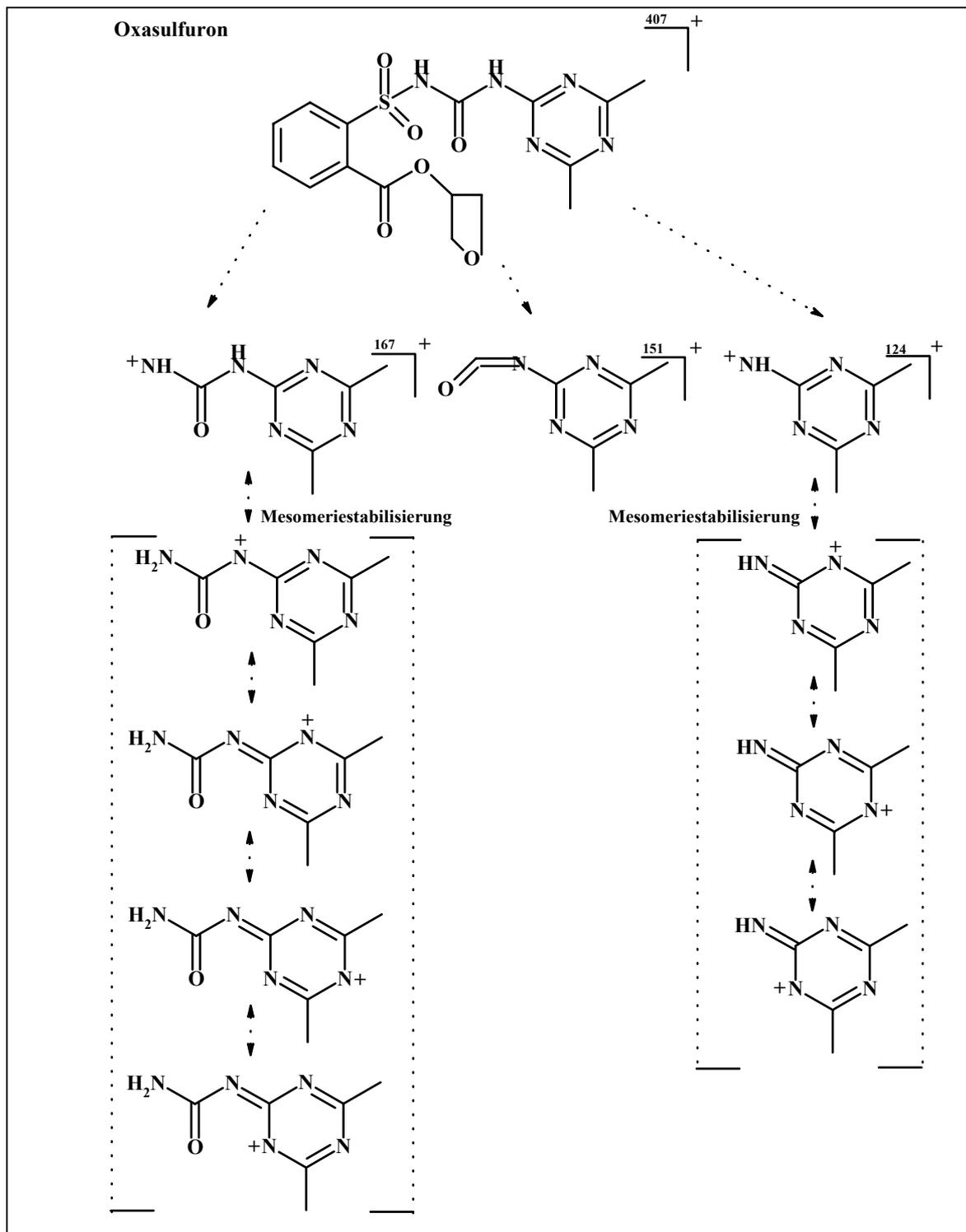
Zur weiteren Bestätigung der gebildeten Metabolite wurde bei alle drei Sulfonylharnstoffen Tandem-MS-Messungen durchgeführt, die in Anschluß der MS-Ergebnisse gezeigt wurden (Abb 58).

Bei **Triasulfuron** wurden Metabolite erhalten, die durch  $\alpha$ -Spaltung der Carbonylgruppe der Harnstofffunktion (vor und nach der Carbonyl-Gruppe:  $m/z = 184, 171, 141$ ) entstanden sind (Abb. 55). Für  $m/z = 127$  erfolgte eine Abspaltung einer Methylgruppe an Position 2 oder der Methylgruppe der Methoxyfunktion an Position 4 des Triazin-Rings.

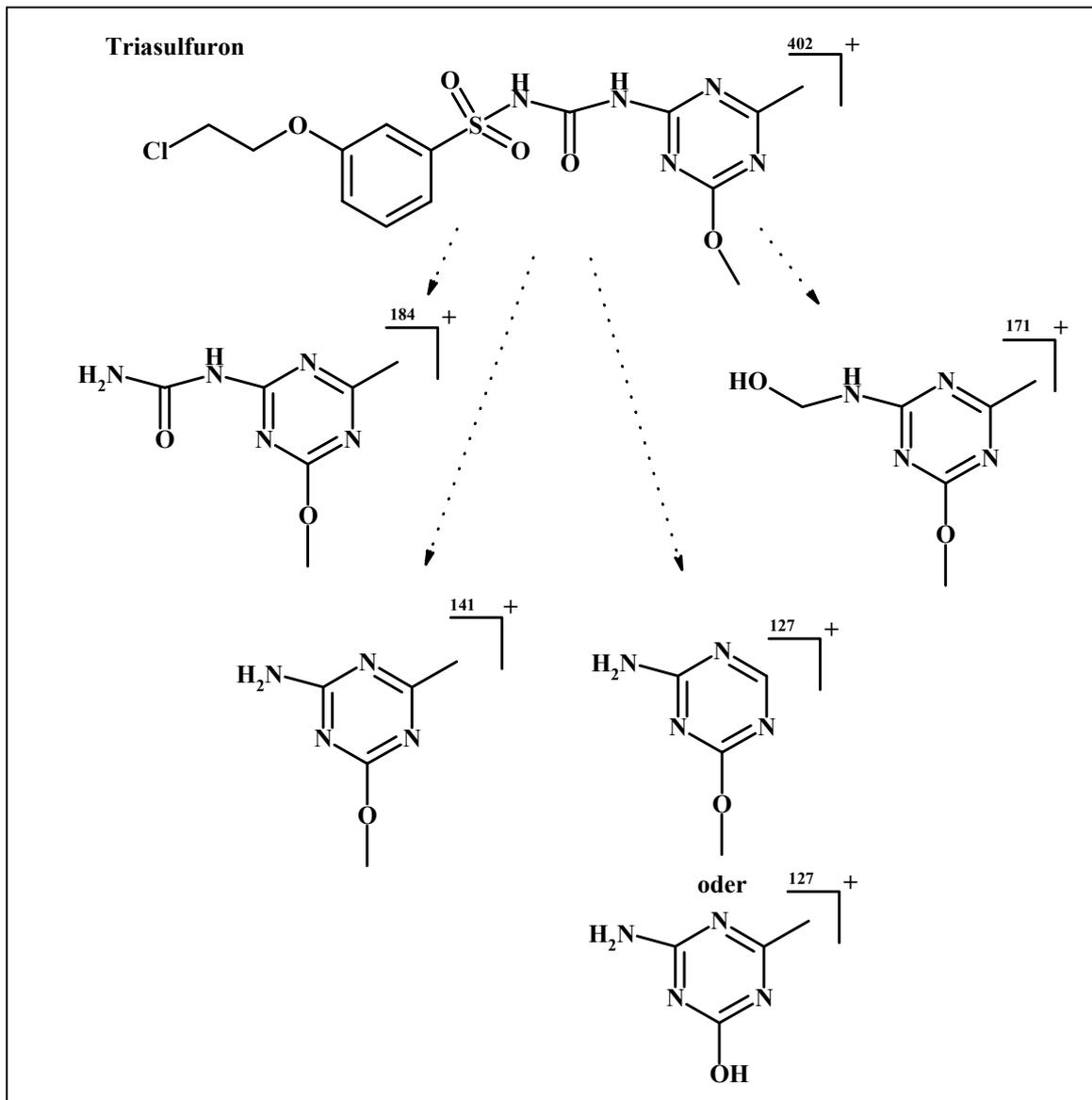
Bei **Thifensulfuron** ließen sich fünf stabile Metabolite nachweisen (Abb. 57, Seite 149).  $M/z = 184$  entstand durch Spaltung der Benzylsulfonamid-Bindung,  $m/z = 222$  und  $m/z = 141$  durch  $\alpha$ -Spaltung der Carbonylgruppe der Harnstofffunktion,  $m/z = 127$  durch  $\alpha$ -Spaltung der Carbonylgruppe der Harnstofffunktion sowie einer Demethylierung an Position 2 des s-Triazin-Rings oder an der Methoxygruppe (Position 4).

Der Metabolit mit der „Quasimolekülmasse“  $m/z = 189$  zeigte einen anderen Abbau; es fand an Position zwei des s-Triazin-Rings (oder an der Methoxygruppe) eine Demethylierung sowie eine Abspaltung von dem Thiazol-Ring (Position 3) unter Verlust eines Sauerstoffatoms an der Sulfonylgruppe und einer dadurch verbundenen Absättigung des Schwefelatoms mit einem Wasserstoffatom statt. Dieser entstandene Metabolit lag in der ,

Lösung stabil als Kation vor, zusätzlich konnten fünf weitere mesomere Grenzstrukturen formuliert werden, die die Bildungswahrscheinlichkeit dieses Fragments unterstützen.

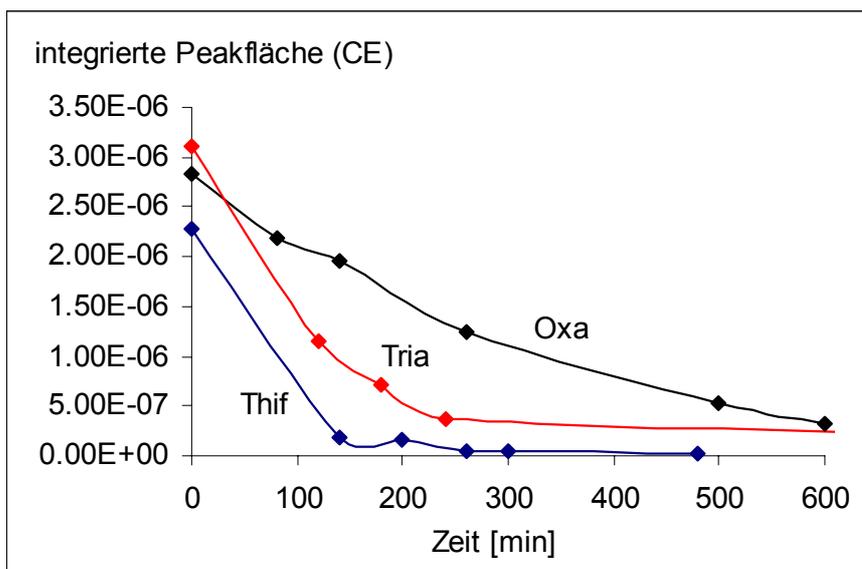


**Abb. 54:** Bildung der Metabolite (Oxasulfuron) während der Bestrahlung im Suntest (10 Stunden); als  $[M+H]^+$  im ESI nachgewiesen; Nachweis durch online high pressure CE-MS-Messungen bei den ionischen Metaboliten ließen sich Grenzstrukturformeln formulieren, die einen Hinweis auf die Stabilität gaben.



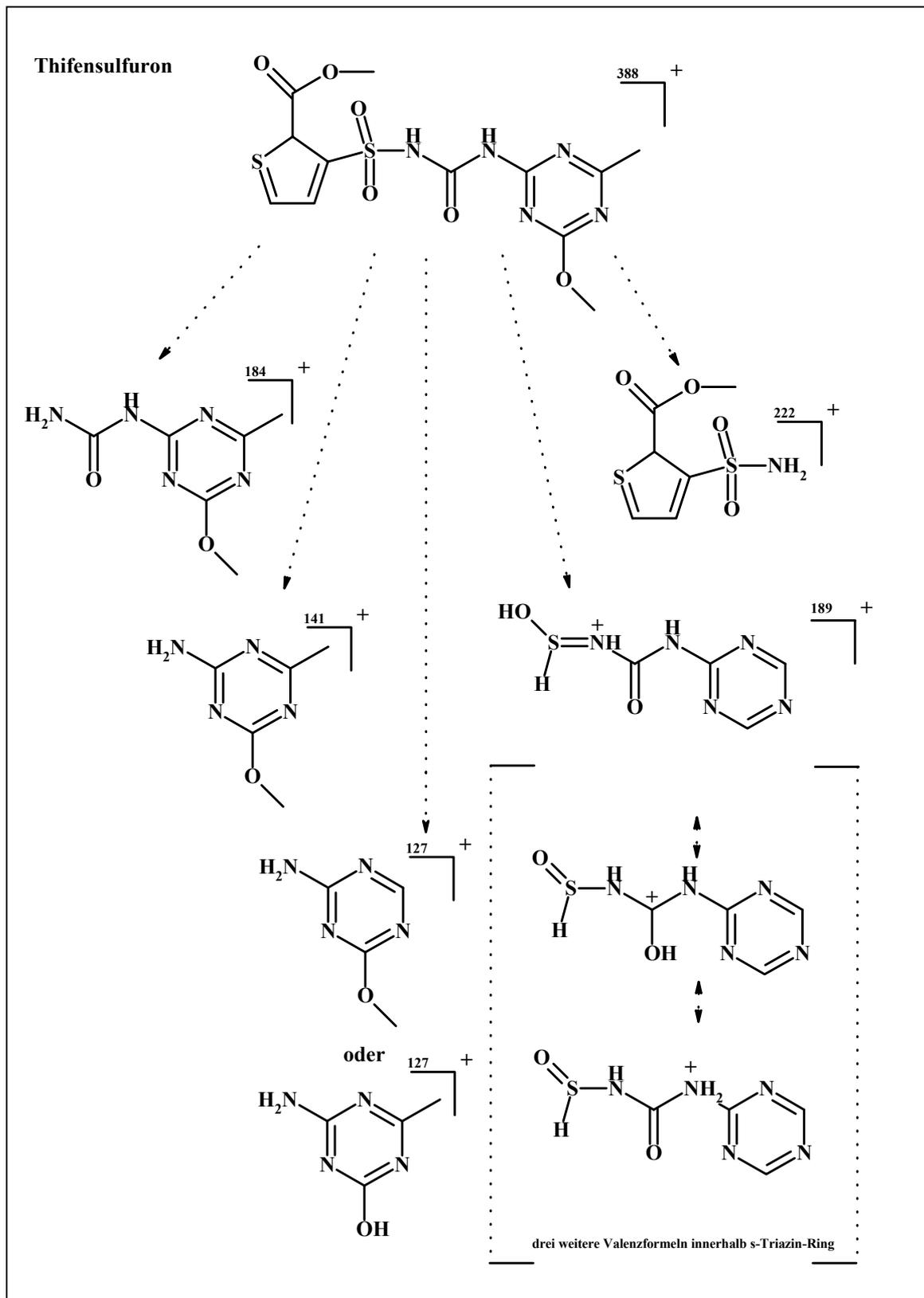
**Abb. 55:** Bestrahlung von Triasulfuron (Suntest). Darstellung der erhaltenen Metabolite (vgl oben).

Auffallend war, daß Oxasulfuron die wenigsten gebildeten Abbaumetabolite zeigte im Gegensatz zu Thifensulfuron mit den meisten. Betrachtet man hierzu die Abbauraten der Stoffe während der gesamten Bestrahlungszeit, so wurde Thifensulfuron (Thif) am schnellsten und Oxasulfuron am langsamsten abgebaut (Abb. 56).



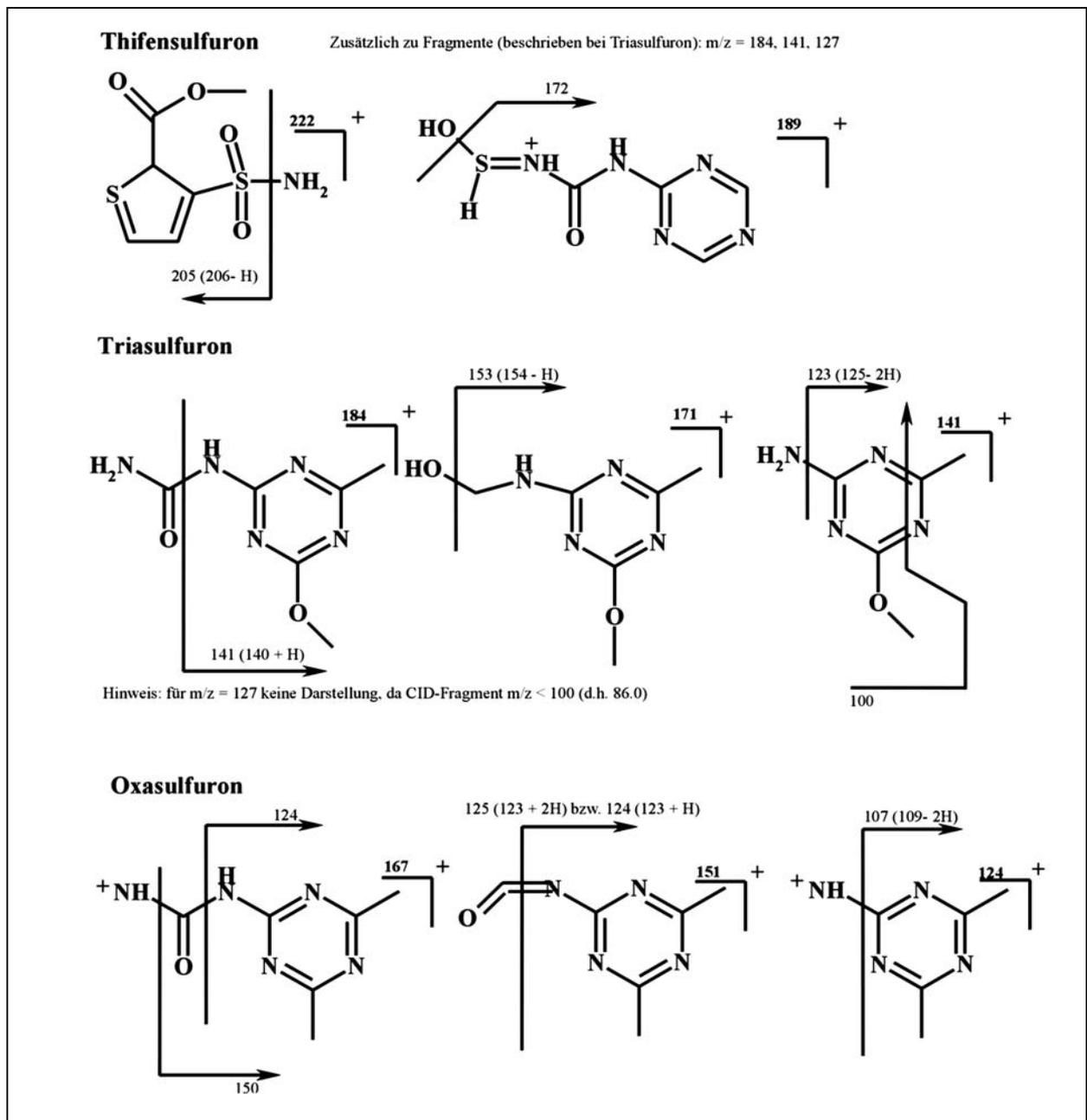
**Abb. 56:** Abbaurrate von Thifensulfuron, Triasulfuron und Oxasulfuron während der Bestrahlung im Suntest [nach Laura Scrano]

Der Grund für die Stabilität des Oxasulfuron lag in der chemischen Struktur. Es konnten intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden, die Oxasulfuron innerhalb des Moleküls stabilisieren. Das war bei Triasulfuron und Thifensulfuron von der sterischen Ausrichtung nicht möglich. Weiterhin wurde festgestellt, daß es Übereinstimmungen in der Fragmentbildung zwischen Thifensulfuron und Triasulfuron gab. Bei beiden Stoffen ließen sich  $m/z = 184$ ,  $141$  und  $127$  derselben Struktur zuordnen. Oxasulfuron zeigte keine Übereinstimmungen; dieses Molekül unterschied sich deutlich in der Substituierung.



**Abb. 57:** Bildung der Fragmente von Thifensulfuron während Suntest (Erläuterungen siehe Text), vgl Abb. 54

Um wie eingangs erläutert die Struktur der einzelnen gebildeten Metabolite zu untermauern, wurden MS-MS-Messungen durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 58 gezeigt sind.



**Abb. 58:** Untermauerung der Metabolite von Oxasulfuron, Triasulfuron und Thifensulfuron durch CID-Fragmentierung, angegeben sind die Bildungswege mit den zugehörigen „Spaltfragmenten“ als  $[M+H]^+$  im ESI nachgewiesen.

#### 4.4.3.4.2 CZE-ESI-MS-Messungen

Für Messungen in CZE-ESI-MS mußten Einstellungen vorgenommen werden, die auf der in Abschnitt 4.3.1 ff beschriebenen Optimierungen beruhen.

In Vorexperimenten wurde der Abstand ESI-needle zu heated capillary unter Verwendung von ausgewählten s-Triazin-Herbizide bei zwei verschiedenen pH-Werten optimiert (pH 6.8 und 10.0, Abschnitt 4.3.8 ).

Hier wurde klar, daß bei einem Abstand von 3.5 mm (pH 6.8) und einer ESI-Spannung von 3.6 kV optimale Signale erhalten wurden. Die CE-Spannung wurde konstant bei 30 kV, der sheath gas flow bei 5 arb gelassen. Auf dieser Basis wurden Experimente mit Oxasulfuron, Triasulfuron und Thifensulfuron im CZE-ESI-MS-Modus durchgeführt.

Da Trennungen dieser drei Substanzen im CZE-Modus mit 25 kV getestet wurden, wurde im CZE-ESI-MS-Betrieb eine ebenso effektive CE-Spannung von 25 kV (CE-Spannung: 28.6-3.6 (ESI-Spannung) eingestellt.

Jedoch stellten wir fest, daß eine ESI-Spannung von 3.6 ESI-kV bei Verwendung eines 10 mM Ammoniumacetat-Puffers, pH 3.6 nicht ausreichte, um während der Dauer eines Trennlaufes einen stabilen Spray zu gewährleisten. Deshalb wurde die ESI-Spannung auf 4.6 kV erhöht.

Diese Bedingungen ließen Experimente im Positivmodus zu. Die Optimierung der Temperatur der heated capillary ist unter 4.3.7 f beschrieben. Für Messungen im positiven Bereich wurde ein Standardgemisch als sheath liquid verwendet: Methanol/Wasser/Ameisensäure:50/49/1.

Bei zwei verschiedenen pH-Werten (vgl. Abschnitt 4.4.3.3) wurden CZE-ESI-MS-Messungen der drei Sulfonylharnstofffraktionen vorgenommen. Wichtig ist hervorzuheben, daß wir nur im positiven Modus gemessen haben, da zu diesem Zeitpunkt der negative Modus noch nicht optimiert war.

In Tab. 26 sieht man das Ergebnis der Untersuchungen:

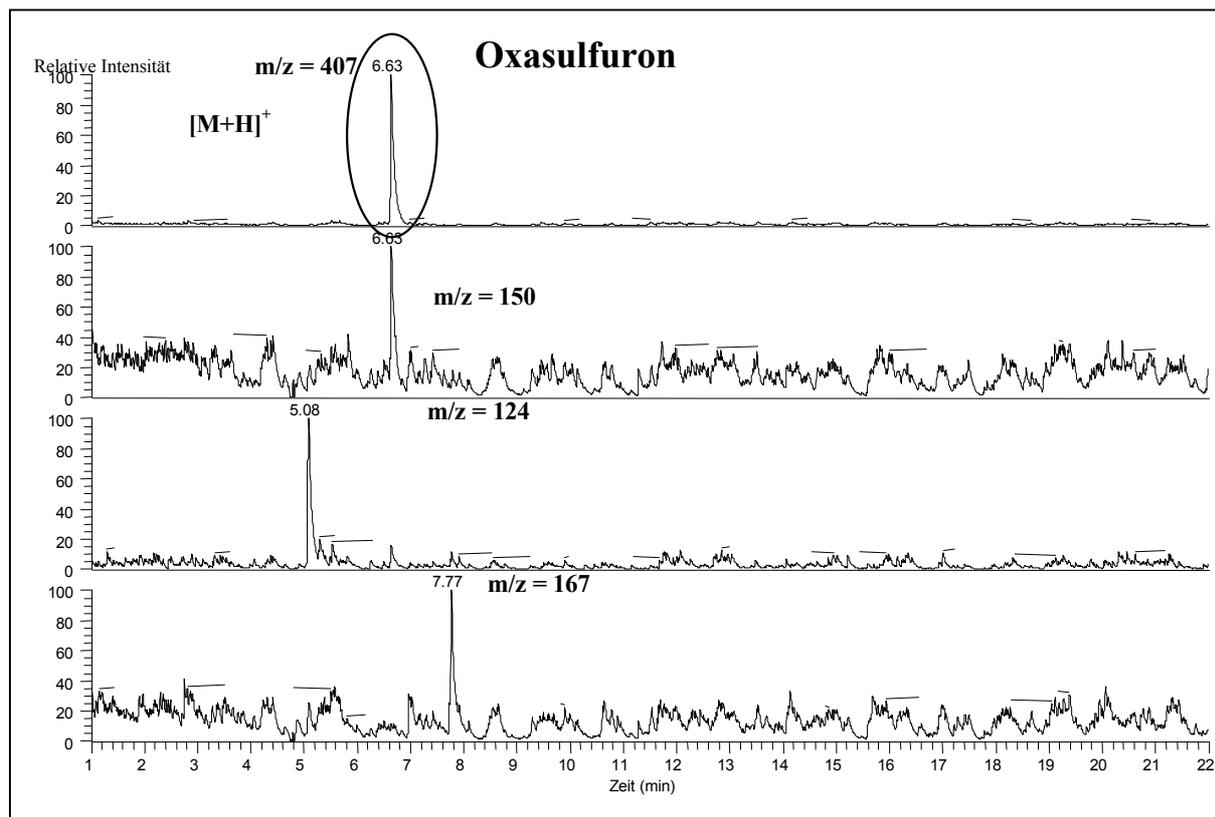
pH	Oxasulfuron [m/z]	Triasulfuron [m/z]	Thifensulfuron [m/z]
9.05	407, 150.7, 124.1, 167.1	184.1, 171.1, 141.1, 127.1	189.1, 184.1, 141.1, 127.0, 222.0
3.6	407, 150.7, 124.1, 167.1	184.1, 141.1, 127.1	189.0, 184.1, 141.1, 127.0, 222.0

**Tab. 26:** Nachgewiesene Metabolite); als  $[M+H]^+$  im ESI bei zwei verschiedenen pH-Werten im CZE-ESI-MS-Modus nach Optimierung des Systems (vgl. oben)

Bei diesen Messungen konnten die in Abschnitt 4.4.3.4.1 dargestellten Metabolite nach der CZE-Trennung im ESI-Massenspektrum nachweisen, was einen weiteren Hinweis auf die Existenz dieser Abbauprodukte gab.

Allerdings wurde festgestellt, daß im Falle des Triasulfuron  $m/z = 171$  nur bei pH 9.05 nachgewiesen werden konnte. Hierfür war die Ursache in den Säure-Base-Verhalten zu suchen. Aufgrund eines hohen pKa-Wertes war davon auszugehen, daß bei pH 3.6 die neutrale, nicht protonierte Form begünstigt war. Das würde bedeuten, daß auch der Metabolit im Elektrospray schlecht protonierbar war. Bei pH 9.05 dagegen würde sich das nach der Henderson-Hasselbalchschen Gleichung berechenbare Verhältnis von ionisierter zu nichtionisierter Form dagegen leicht in Richtung der ionisierten Form verschieben. Das könnte eine mögliche Protonierung im Elektrospray begünstigen. Der mittels PALLAS für Windows berechneten pKa würde diese These stützen ( $m/z = 171$ : 14.55).

Im Falle des Oxasulfuron sei der Leser auf folgende Abbildung 59 verwiesen, in der die massenspektrometrische Darstellung der getrennten Fragmente erfolgte. Für die beiden anderen Sulfonylharnstoffe werden die Fragmente in Tab. 27 nach ihren Migrationszeiten aufgelistet.



**Abb. 59:** CZE-ESI-MS-Trennung der Oxasulfuron-Fraktion bei pH 9.05. CE- Bedingungen: 25 kV, 15 sec Injektion, MS-Bedingungen: 4.6 ESI-KV, heated capillary: 100 °C; sheath gas Fluß: 5 arb, sheath liquid: Methanol/Wasser/Ameisensäure: 50:49:1; Abstand ESI-needle zu heated capillary 4 mm

Fraktion	pH	Fragment	Fragment	Fragment	Fragment	Fragment
		m/z=407	m/z=167	m/z=150	m/z=124	-
Oxa L 10	3.6	9.13 min	8.71 min	9.13 min	8.68 min	-
Oxa L 10	9.05	6.63 min	7.77 min	6.63 min	5.08 min	-
		m/z=184	m/z=171	m/z=141	m/z=127	-
Tria L22	3.6	8.99 min	-	8.52 min	8.53 min	-
Tria L22	9.05	8.33 min	16.34 min	16.33 min	6.23 min	-
		m/z= 222	m/z =189	m/z=184	m/z= 141	m/z=127
Thif L 10	3.6	8.65	8.65	8.64	8.11	8.17
Thif L 10	9.05	5.28	5.48	5.11	5.11	6.01

**Tab. 27:** Auflistung der in CZE-ESI-MS von Oxasulfuron, Triasulfuron und Thifensulfuron nachgewiesenen Fragmente; Trennbedingungen: siehe Abb. 59, vgl auch Anmerkungen zu Abb. 54

#### 4.4.3.5 Partial filling (PF) MEKC-ESI-MS der Standardsubstanzen

In der PF-MEKC-ESI-MS war es möglich, sich in ihrer Hydrophobizität unterscheidende Substanzen zu trennen und separat im ESI-MS nachzuweisen.

Die Hydrophobizitätswerte sind in folgender Tabelle 28 zusammengestellt.

Substanz	Log P bzw. log $K_{OW}$	Fundstelle
<b>Triasulfuron</b>	-0.58 (pH 7) -0.59 (25°C) 1.04	*) [Bahadir et al., 2000] **)
<b>Oxasulfuron</b>	0.89	**)
<b>Thifensulfuron</b>	-1.7 (pH 7) 0.027 (25 °C) 0.36	*) [Bahadir et al., 2000] **)

**Tab. 28** : Hydrophobizitäten (log P bzw. log  $K_{OW}$ ) von Triasulfuron, Oxasulfuron und Thifensulfuron, berechnet bzw. andere Fundstellen. \*) [www.wizard.arsusda.gov/acsl/textfiles](http://www.wizard.arsusda.gov/acsl/textfiles), \*\*) Berechnung mit PALLAS für Windows 3.1

Im Vergleich der Log P- bzw log  $K_{OW}$ - Literaturwerte fiel auf, dass die Literaturwerte zeigten stets niedrigere Werte anzeigten als die mit PALLAS berechneten. Deshalb wurden die Literaturwerte zur Interpretation herangezogen.

Was aufgrund der schwachen und fast gleichen Hydrophobizität der Analyten vermutetet wurde (Tab. 28) war keine Trennung der drei Sulfonylharnstoffe im mizellaren Modus möglich.

Zudem erhöhte sich in der PF-MEKC-ESI-MS-Messung die Migrationzeit unter Verwendung eines 10 mM Ammoniumacetat-Puffers, pH 6.0, 20 mM SDS und 10 % Methanol auf ca. 18.3 min (40 % Kapillarenfüllung, ohne Abb.).

Somit eignete sich diese Technik nicht für die Trennung der Sulfonylharnstoffe.

#### 4.4.3.6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Photostabilität dreier Sulfonylharnstoffherbizide Triasulfuron, Oxasulfuron und Thifensulfuron und der durch die Bestrahlung der Moleküle entstandenen Metabolite wurden in der CE-ESI-MS untersucht. Es ließ sich feststellen, dass Oxasulfuron am langsamsten, Thifensulfuron am schnellsten abgebaut wurde. Triasulfuron nahm eine Mittelstellung ein.

Deswegen konnten bei Thifensulfuron die meisten und bei Oxasulfuron die wenigsten Metabolite in der CE-ESI-MS festgestellt werden. Die Entstehung der Metabolite begründete sich hauptsächlich auf eine  $\alpha$ -Spaltung der Carbonylgruppe der Harnstofffunktion. In flow injection-Messungen konnte das auf der Basis von [Garcia et al., 1992] nachgewiesen werden.

Eine dort beschriebene Spaltung der (Benzyl)sulfonamid-Bindung wurde nur im Falle des Triasulfurons bzw. Thifensulfurons bestätigt.

Diese Metabolite wurden unter Anwendung der optimierten CE-ESI-MS-Parameter, sheath gas, sheath liquid, Abstand ESI-needle zu heated capillary) getrennt, so dass eine eindeutige Identifizierung und Zuordnung möglich war. Die PF-MEKC-ESI-MS war aufgrund der schwachen Hydrophobizität der Standardsubstanzen für deren Analytik nicht geeignet.

Jedoch wurde nicht getestet, ob PF-MEKC-ESI-MS für eine Trennung der entstandenen Metabolite geeignet wäre. Jedoch läßt sich aufgrund der Struktur der Metabolite vermuten, daß eine Trennung im mizellaren Modus nicht möglich wäre (zu polar, keine aliphatischen Reste, die hydrophobische Wechselwirkungen eingehen können).

#### 4.4.4 Qualitativer und quantitativer Nachweis von Homoserinlactonen

Homoserinlactone können u.a. dünn-schichtchromatographisch nachgewiesen werden. Eine Trennung der Moleküle im CE-ESI-MS-Modus wurde jedoch noch nicht in der Literatur beschrieben. Deshalb wurden ausgewählte Homoserinlactone (HHL, OHL und DHL) einer CE-ESI-MS-Trennung unterworfen. Im ersten Schritt wurden durch collisionsinduzierte Fragmentierung charakteristische Fragmente bestimmt, die in einer später durchgeführten Realenprobenmessung zur eindeutigen Identifizierung und somit Unterscheidung der Homoserinlactone von anderen Substanzen herangezogen werden konnten.

Quantitativ wurden die Nachweisgrenzen auf Basis der optimierten CE-ESI-MS-Parameter bestimmt. Welche Möglichkeiten ergaben sich dadurch?

##### 4.4.4.1 Allgemeiner Teil

Bei gram-negativen Bakterien kommen *N*-Acyl-L-homoserinlactone (AHL) für Zell-Zell-Kommunikationen zum Einsatz. Sie bestehen aus einem Lactonring, der allen gemeinsam ist und unterscheiden sich durch die Länge und Modifikation der Acyl-Seitenketten. Die Länge der Seitenketten variiert zwischen vier und vierzehn Kohlenstoffatomen, wobei die Modifikation mit Oxo- oder Hydroxylgruppen [Eberl, 1999] an der C3-Position stattfindet. Abbildung 60 zeigt die Grundstruktur einiger identifizierter AHL - Moleküle.

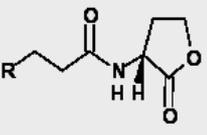
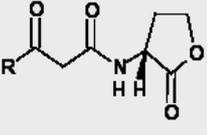
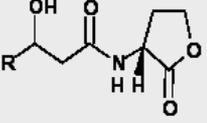
	R	Chemische Bezeichnung	Abkürzung	Molekulargewicht
	CH <sub>3</sub>	<i>N</i> -Butanoyl-L-HSL	BHL	171
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	<i>N</i> -Hexanoyl-L-HSL	HHL	199
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	<i>N</i> -Octanoyl-L-HSL	OHL	227
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	<i>N</i> -Decanoyl-L-HSL	DHL	255
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CHCH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	7,8- <i>cis</i> - <i>N</i> -(Tetradecanoyl)-L-HSL	7,8- <i>cis</i> -tDHL	311
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	<i>N</i> -(3-Oxohexanoyl)-L-HSL	OHHL	213
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	<i>N</i> -(3-Oxooctanoyl)-L-HSL	OOHL	241
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	<i>N</i> -(3-Oxodecanoyl)-L-HSL	ODHL	269
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>	<i>N</i> -(3-Oxododecanoyl)-L-HSL	OdDHL	297
	CH <sub>3</sub>	<i>N</i> -(3-Hydroxybutanoyl)-L-HSL	HBHL	186
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CHCH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	7,8- <i>cis</i> - <i>N</i> -(3-Hydroxytetradecanoyl)-L-HSL	7,8- <i>cis</i> -HtDHL	326

Abb. 60: Strukturen der *N*-Acyl-L-homoserinlactone [nach Geisenberger, 2000]

Diese auch Autoinducer genannten Signalmoleküle werden von Mikroorganismen eingesetzt, um die eigene Populationsdichte zu erkennen. Kommunikationssysteme mit denen die Populationsdichte erkannt werden kann, werden als Quorum-Sensing-Systeme bezeichnet [Fuqua et al., 1994].

Die Reaktionen, die durch AHL-vermittelte Zell-Zell-Kommunikation ausgelöst werden, sind sehr verschieden. Neben Biolumineszenz-Erscheinungen bei manchen Bakterienarten, werden bei *Burkholderia cepacia* verschiedene extrazelluläre Virulenzfaktoren durch Acyl-L-homoserinlactone kontrolliert [Lewenza et al., 1999].

Unsere Aufgabe bestand darin, mittels CE-ESI-MS den Nachweis sowie die quantitative Analytik (Voruntersuchungen) der AHL-Moleküle von dieser Bakterienart zu erbringen.

#### 4.4.4.2 MS/MS-Experimente

Im ersten Schritt der Untersuchungen war es wichtig, das Elektrospray-Verhalten der AHL-Moleküle abzuchecken. Hierzu wurden Standards online über CE - flow injection (high pressure) ins MS gebracht (Abb. 61, 62) und diese energieinduziert fragmentiert. Dabei kristallisierte sich das Fragment mit  $m/z = 102$  heraus, das allen drei AHL-Molekülen gemeinsam zugrunde lag. Schon 1997 erkannte Wood [Wood et al., 1997] durch LC-ESI-MS-Messungen von AHL-Standards dieses charakteristische Fragmentierungsprodukt.

$M/z = 127$  von OHL und  $m/z = 155$  von DHL basierten auf demselben Fragmentierungsmuster; sie unterschieden sich nur in der Länge der Seitenkette.  $M/z = 228$  (DHL) und  $m/z = 200$  (OHL) waren ähnlich wie HHL aufgebaut, auch hier war die Länge der Seitenkette ausschlaggebend.

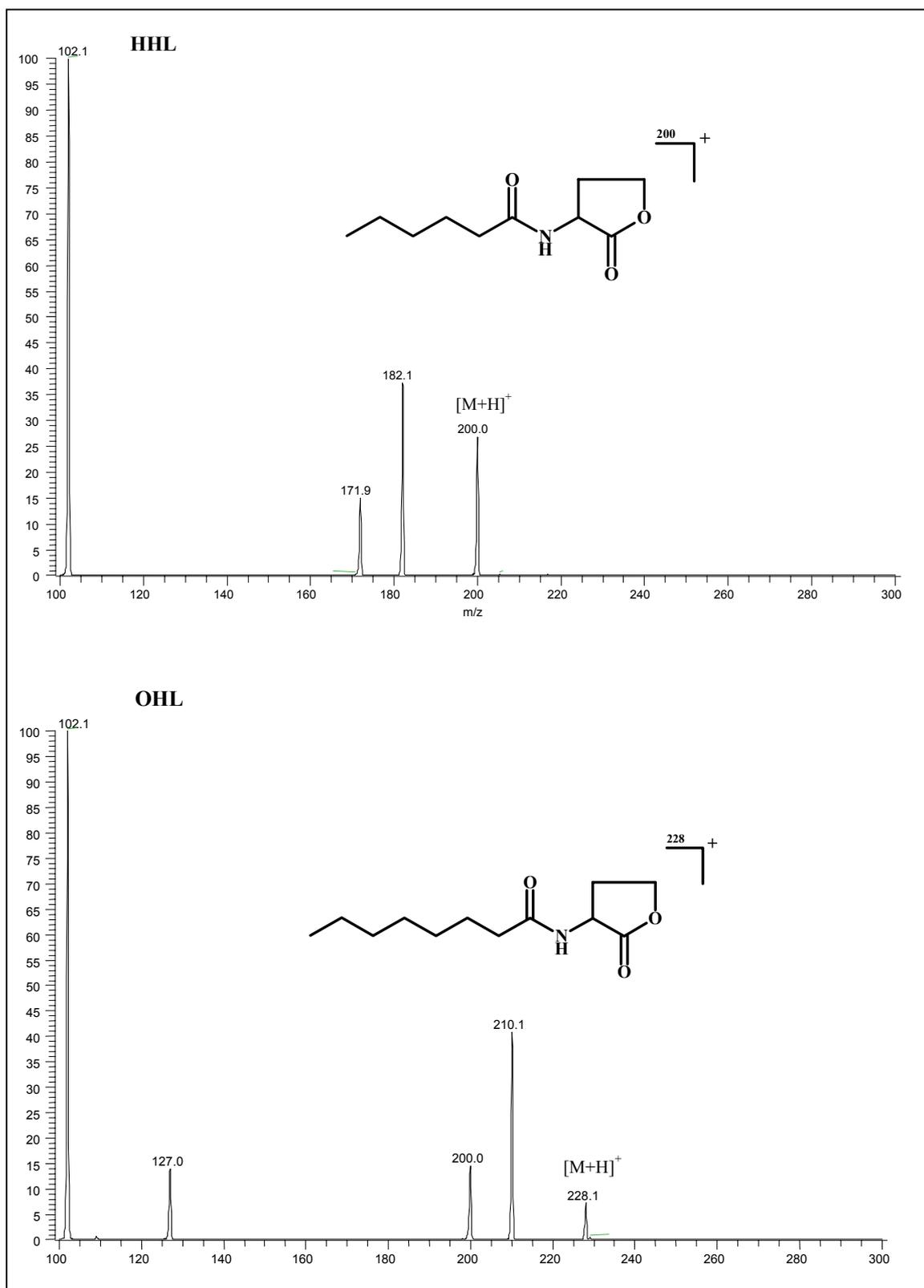
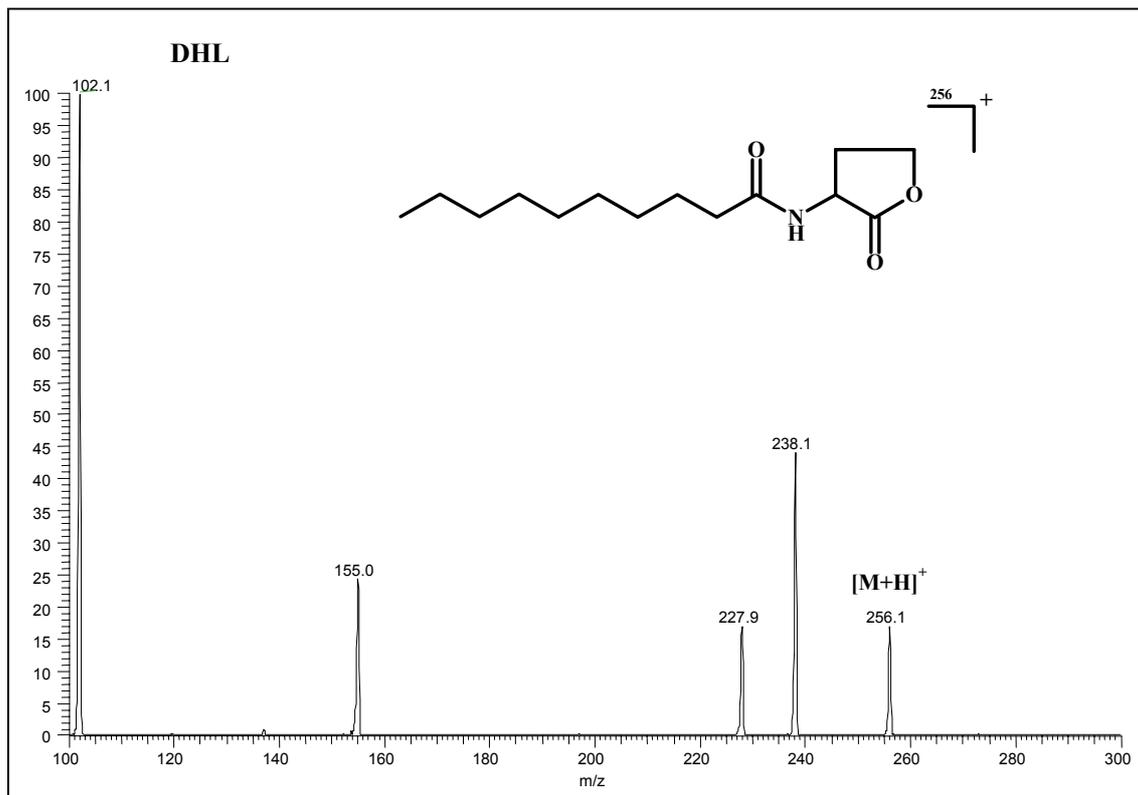
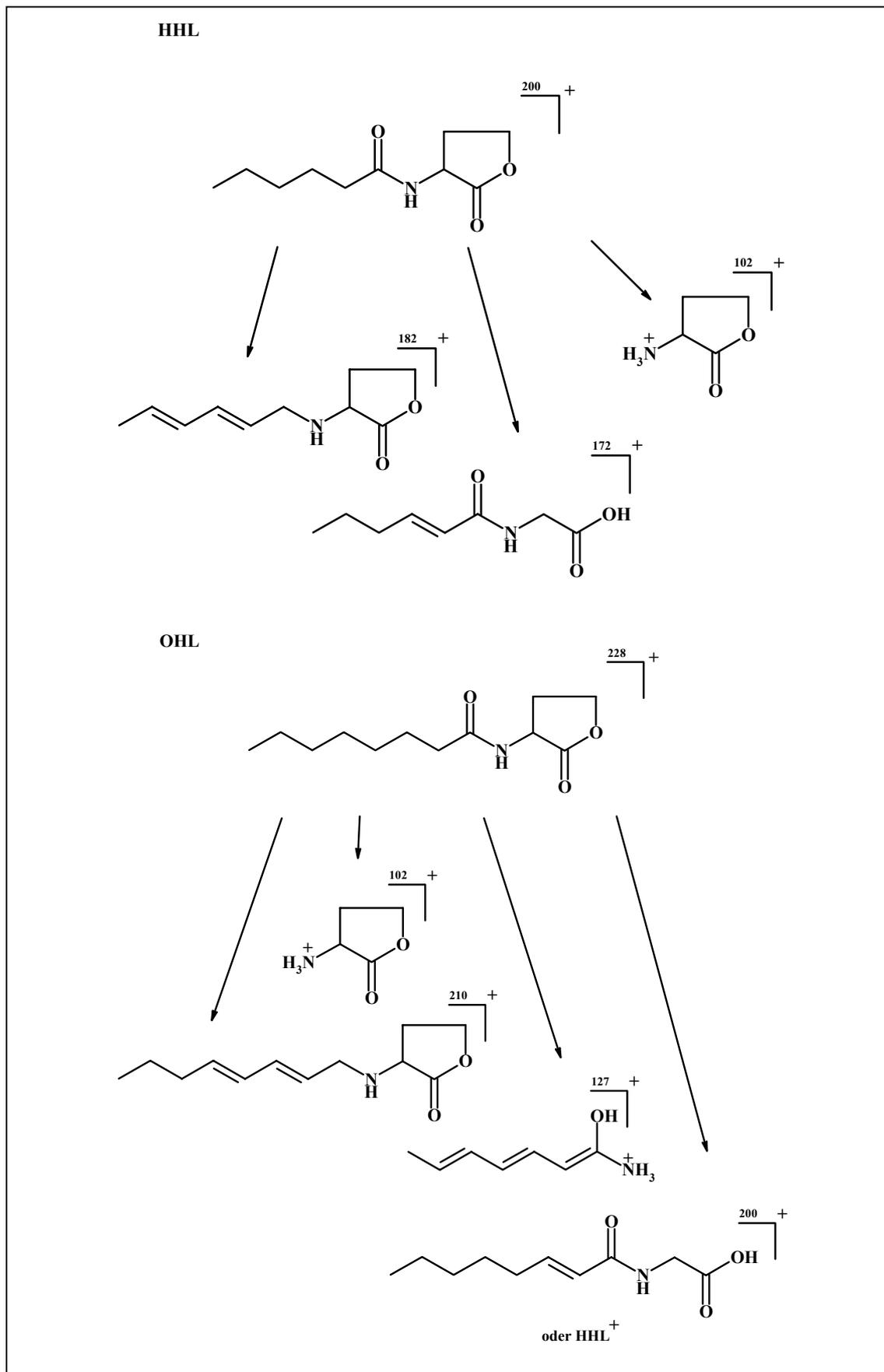


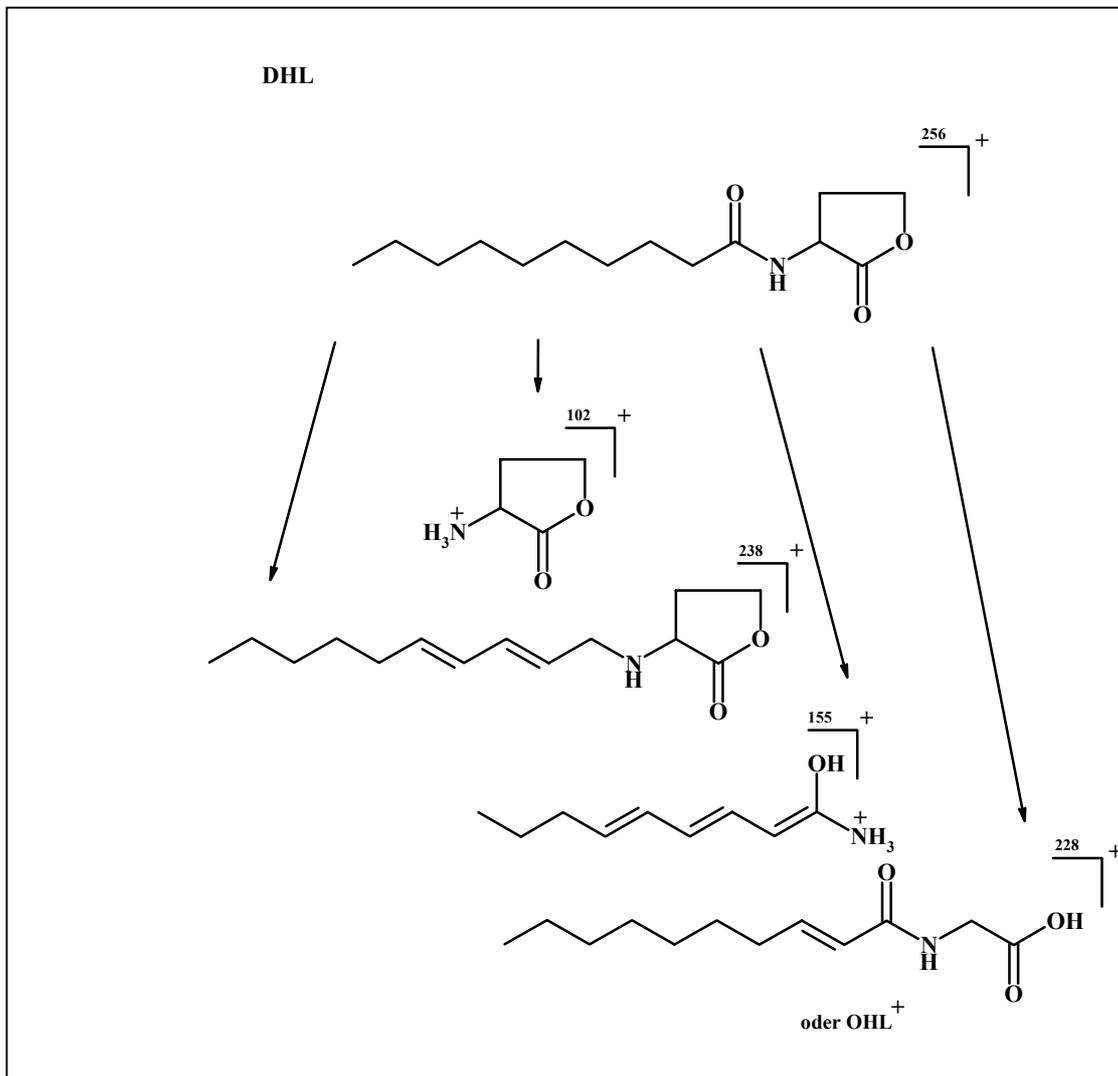
Abb. 61: Energieinduzierte Fragmentierung von HHL und DHL



**Abb. 61: (Fortsetzung):** Energieinduzierte Fragmentierung von DHL



**Abb. 62:** CID-Fragmentierung von HHL und OHL bei Einwirkung von 23 bzw. 25 % relativer Energie (korrespondierende Erklärung zu Abb. 61)



**Abb. 62 (Fortsetzung):** CID-Fragmentierung von DHL bei Einwirkung 25 % relativer Energie (korrespondierende Erklärung zu Abb. 61)

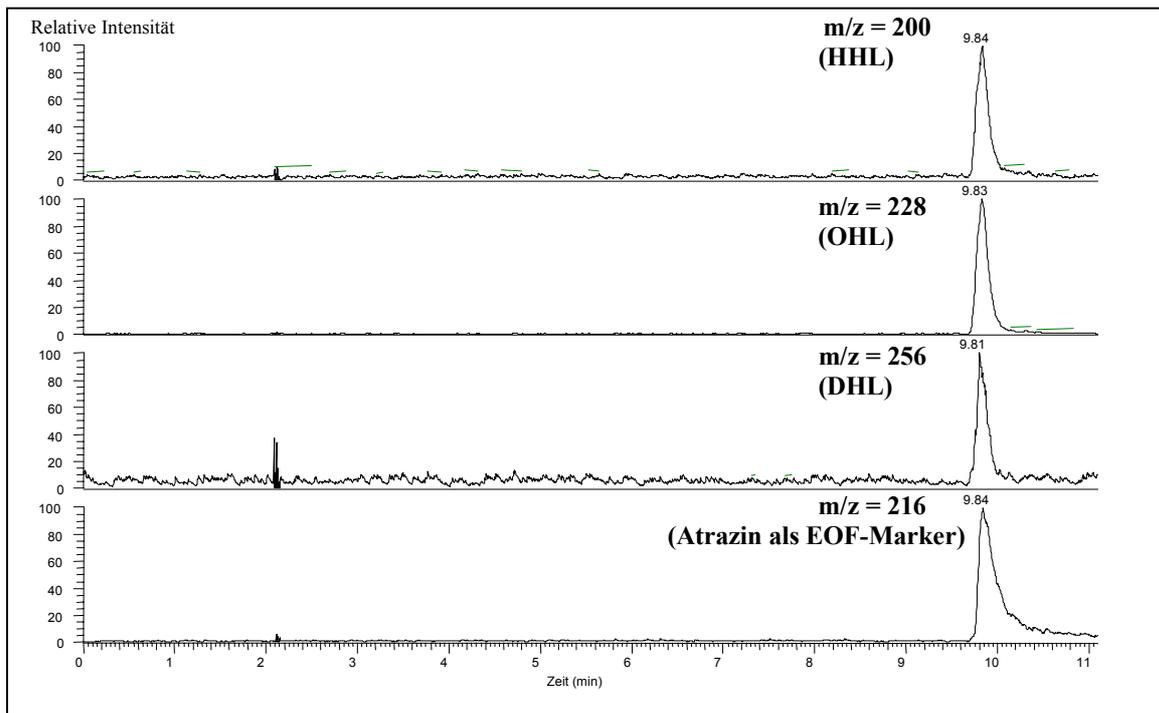
Welche Wege standen durch die Kenntnis des Fragmentierungsschemas und der erhaltenen Hauptfragmente der drei AHL-Standards offen? Das soll in den nächsten Abschnitten erörtert werden.

#### 4.4.4.3 Qualitative Analyse mittels CZE-ESI-MS und PF-MEKC-ESI-MS

War eine Trennung der drei verschiedenen AHL-Moleküle möglich?

Untersuchungen in CZE-ESI-MS zeigten bei Variierung des pH-Wertes (4.5-2.7) und der Puffermolarität von 10 bis zu 100 mM (bei pH 2.7) keine Trennung der AHL-

Moleküle (Abb. 63, pH 4.5). Aufgrund der ansteigenden Länge des aliphatischen Restes von HHL über OHL zu DHL nahm die Hydrophobizität des Moleküls zu. Allen gemeinsam war aufgrund der ähnlichen Struktur die geringe Tendenz der Protonaufnahme bei den untersuchten pH-Werten.



**Abb. 63:** CZE-ESI-MS-Trennung von HHL ( $m/z = 200$ , 1. Spur), OHL ( $m/z = 228$ ; 2. Spur) und DHL ( $m/z = 256$ ; 3. Spur) unter Verwendung eines 10 mM Ammoniumacetat-Puffers, pH 4.5. Die 4. Spur repräsentiert Atrazin ( $m/z = 216$ ), ein Chloro-s-Triazin, das bei diesem pH-Wert neutral vorlag und deshalb als EOF-Marker verwendet werden konnte. CE-Bedingungen: Standardkonzentrationen: 40 ppm; CE-Spannung: 30 kV, AHL-Injektion: 8 sec. low pressure, EOF-Injektion: 2 sec. low pressure; ESI-MS-Bedingungen: ESI-Spannung: 5 kV, sheath gas: 0 arb, sheath liquid: Methanol/Wasser/Ameisensäure @ 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ , Temperatur heated capillary: 170  $^{\circ}\text{C}$ , Abstand ESI-needle zu heated capillary 5 mm (aufbauend auf Messungen aus Kapitel 4.3.8); Gesamtlänge der CE-Kapillare: 84 cm (75  $\mu\text{m}$  I.D., 360  $\mu\text{m}$  O.D.).

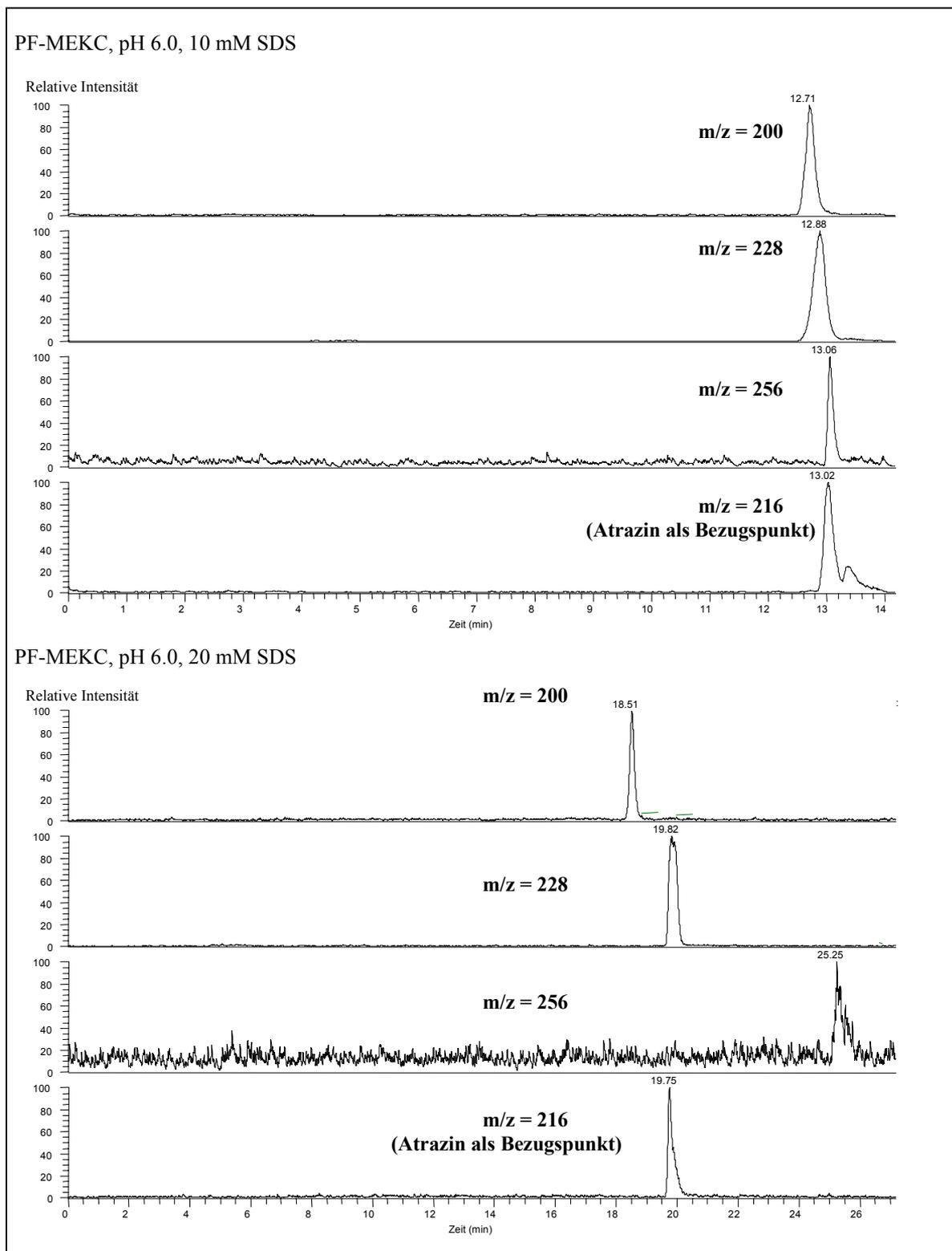
Aufgrund der untereinander unterschiedlichen log P-Werte der Homoserinlactone (Tab. 29) war eine Trennung in PF-MEKC-ESI-MS möglich (Abb. 64).

Substanz	Log P	Berechnungsmethode
HHL	0.86	*)
	0.73	**)
	0.67	***)
	0.70	****)
OHL	1.77	*)
	1.56	**)
	1.47	***)
	1.61	****)
DHL	2.67	*)
	2.40	**)
	2.26	***)
	2.52	****)

**Tab. 29:** Berechnete log P-Werte dreier Homoserinlactone; \*) berechnet mit PALLAS für Windows 3.1, \*\*) Chemoffice 6.0: Berechnungsgrundlage nach Crippen; \*\*\*) Chemoffice 6.0: Berechnungsgrundlage nach Viswanadhan, \*\*\*\*) Chemoffice 6.0: Berechnungsgrundlage nach Broto.

Unter Verwendung eines 10 mM Mizellarpuffes (d.h. mit 10 mM SDS) konnte nur eine leichte Antrennung der AHL-Standards erreicht werden (Abb. 64, oben). Wurde die SDS-Konzentration auf 20 mM erhöht, so trennten sich alle drei Homoserinlactone (Abb. 64, unten).

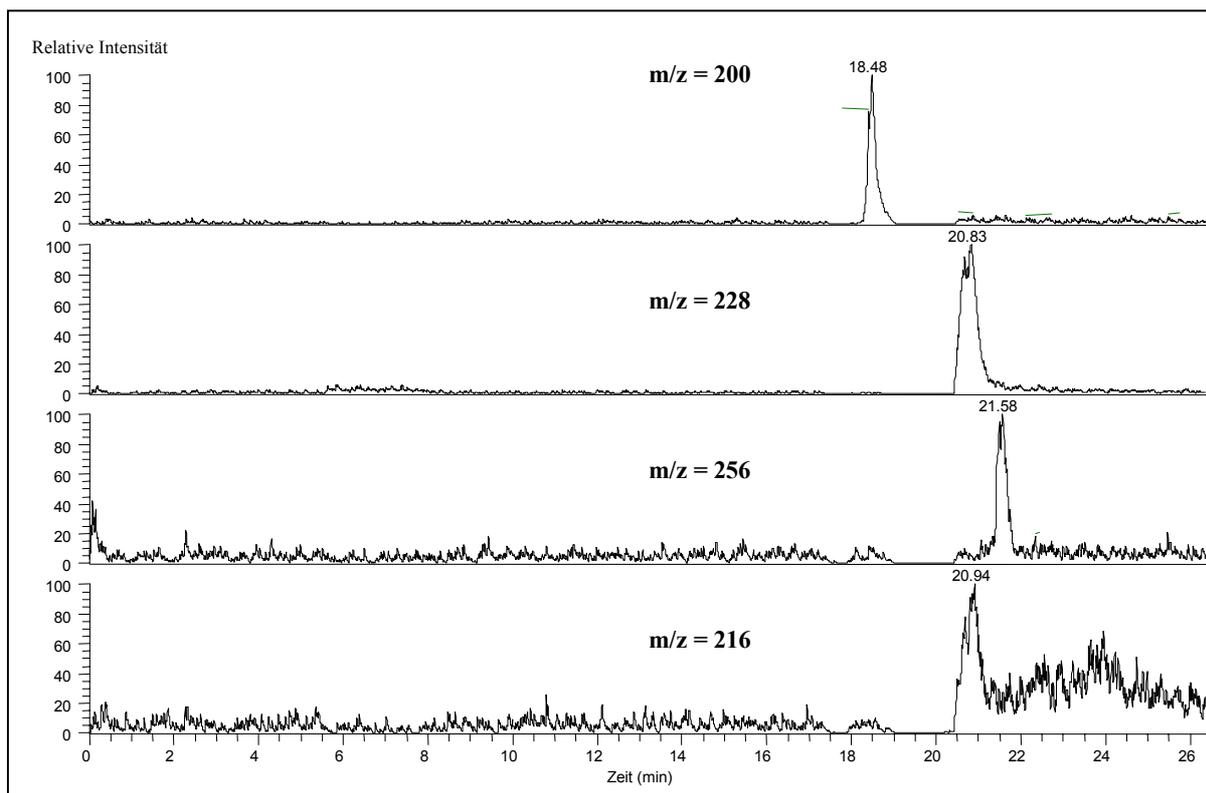
Nur der DHL-Peak war unscharf, was an einer stärkeren Interaktion mit dem apolaren Innenkern der SDS-Mizellen lag. Atrazin ( $m/z = 216$ ) diente in CE-ESI-MS-Experimenten als EOF-Marker, in PF-MEKC-ESI-MS konnte Atrazin nicht als EOF-Marker verwendet werden, da es selbst eine „Eigenhydrophobizität“ besaß. Aufgrund der Prinzipien der MEKC erfolgte bei allen eingesetzten Substanzen eine Trennung aufgrund des unterschiedlichen Hydrophobizitätsverhaltens, Atrazin diente als Bezugspunkt zu den drei AHL-Molekülen.



**Abb. 64:** PF-MEKC-ESI-MS-Trennungen bei pH 6.0 und verschiedenen SDS-Molaritäten; partial filling: 40 % der Kapillarenfüllung (84 cm Gesamtlänge, hier: keine Venturi-Kapillaren; Puffer: 10 mM Ammoniumacetat, pH 6.0, Mizellarpuffer: 10 mM Ammoniumacetat, pH 6.0, 20 mM SDS. CE und ESI-MS-Bedingungen: siehe Abb. 63, einziger Unterschied: CE-Spannung 25 kV statt 30 kV, Konditionierung der Kapillare mit 0.1 M Salzsäure anstatt 0.1 M Natronlauge.

In Abschnitt 4.3.9 ff wurde eine Kopplung von zwei Kapillaren unterschiedlichen Durchmessers durchgeführt (Venturi-Kapillaren). Diese Kopplung wurde für die PF-MEKC-ESI-MS-Technik verwendet. Obwohl eine Beschleunigung der Lösung im zweiten Kapillarenabschnitt erfolgte, konnte bei 40 % Kapillarenfüllung (1. Kapillare) keine Kontamination der ESI-Quelle beobachtet werden.

Durch Erhöhung der SDS-Konzentration von 10 auf 20 mM verschoben sich die Migrationszeiten der Analyten zu höheren Werten (vgl. oben). Durch den Einsatz der Venturi-Kapillaren verringerte sich deutlich die Migrationszeit des DHL (von über 25 min auf ca. 21.5 min), so daß nach ca. 22 min alle Analyten detektiert wurden (Abb. 65). Zudem nahm die Peakschärfe bei dieser Substanz zu, während dagegen Atrazin unscharf und über einen weiteren Bereich „verschmiert“ war.



**Abb. 65:** Anwendung der PF-MEKC-ESI-MS auf Venturi-Kapillaren (Abschnitt 4.2.8 ff; 1. Kapillare: 58 cm 75  $\mu\text{m}$  I.D und 2. Kapillare 24 cm, 50  $\mu\text{m}$  I.D., beide 360  $\mu\text{m}$  O.D.). Bedingungen (CE und ESI-MS) wie in Abbildung 64 beschrieben.

#### 4.4.4.4 Quantifizierung in PF-MEKC-ESI-MS

Die Quantifizierung der drei AHL-Moleküle erfolgte in PF-MEKC-ESI-MS unter Verwendung des Single Reaction Monitoring (SRM).

Mit Hilfe der SRM-Technik kann man durch CID produzierte Fragmente monitoren, d.h. daß das Mutterion in Produktionen dissoziiert. Eines dieser (spezifischen) Ionen wird selektiert und verweilt in der Ionenfalle, woraus sich im Massenanalysator ein Signal ergibt. Quantifizierung mittels SRM ist spezifischer als die SIM-Technik, da das Massenspektrum eines spezifischen Produktions wiederum eines spezifischen Mutterions benutzt wird.

Als Standardkonzentrationen für die Quantifizierung wurden 5, 2.5, 0.5 , 0.25 und 0.08 ppm durchgetestet, wobei mit der SRM-Technik die in Tab. 30 aufgelisteten Konzentrationen nachgewiesen werden konnten.

Substanz	Nachweisbare Konzentration im SRM-Modus ppm, [ $\mu$ M]	R <sup>2</sup> [n=4]
HHL	0.5 [2.5]	0.9731
DHL	0.08 [0.4]	0.9594
OHL	0.21[1.0]	0.9411

**Tab. 30:** Nachweisbare Konzentrationen der drei Homoserinlactone in PF-MEKC-ESI-MS (CE und ESI-MS-Bedingungen: siehe Abb) mit der SRM-Technik, R<sup>2</sup> = Regressionskoeffizient.

Diese nachgewiesenen Konzentrationen stellen keine Nachweisgrenzen (LOD) im eigentlichen Sinne dar, da für DHL und HHL keine Basislinie aufgenommen und somit kein Signal-Rausch-Verhältnis berechnet werden konnte. Zudem waren diese Konzentrationen keine Absolut -, sondern nur Screening-Werte, um die möglich nachweisbaren Konzentrationen herauszufinden.

#### 4.4.4.5 Realprobenmessung in CZE-ESI-MS und PF-MEKC-ESI-MS

Die Aufarbeitung der an Reisswurzeln (aus North Bihar, Indien) lebenden *Burkholderia cepacia*-Stämme erfolgte durch gezieltes Wachstum der Bakterien auf sogenannten LB-Medien (LB: Casein + Hefeextrakt + Natriumchlorid) Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit Dichlormethan ausgeschüttelt und entwässert. Anschließend wurde filtriert, die Dichlormethanphase einrotiert und der trockene Extrakt in Ethylacetat aufgenommen. Regulär erfolgt der Nachweis der Homoserinlactone dünnschichtchromatographisch, wobei hier nur qualitative Auswertungen möglich sind. Diese Vorarbeiten wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Hartmann, Institut für Bodenökologie im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt.

Zwei Realproben wurden bei pH 4.5 in CZE-ESI-MS gemessen. In der ersten Probe war aufgrund von DC-Vorversuchen (Diplomarbeit Valerie Albrecht) das Homoserinlacton mit  $m/z = 228$ , in der zweiten Probe  $m/z = 228$  und  $256$  zu erwarten.

In CZE-ESI-MS, pH 4.5 konnte in der ersten Probe neben  $m/z = 228$  noch  $m/z = 327$  und  $m/z = 183$  detektiert werden (Abb. 66) . Mit großer Wahrscheinlichkeit entsprach  $m/z = 228$  dem erwarteten OHL.  $M/z = 327$  könnte dem HSL 7,8-cis-HtDHL zugeordnet werden. Um eine eindeutige Aussage darüber machen zu können, müßte wie auf Seite 165 f beschrieben verfahren werden,  $M/z = 183$  dagegen war nicht zuordnungsbar. Es wurde vermutet, daß sich dahinter ein unter diesen pH-Bedingungen leicht protonierbares Proteinfragment verbarg.

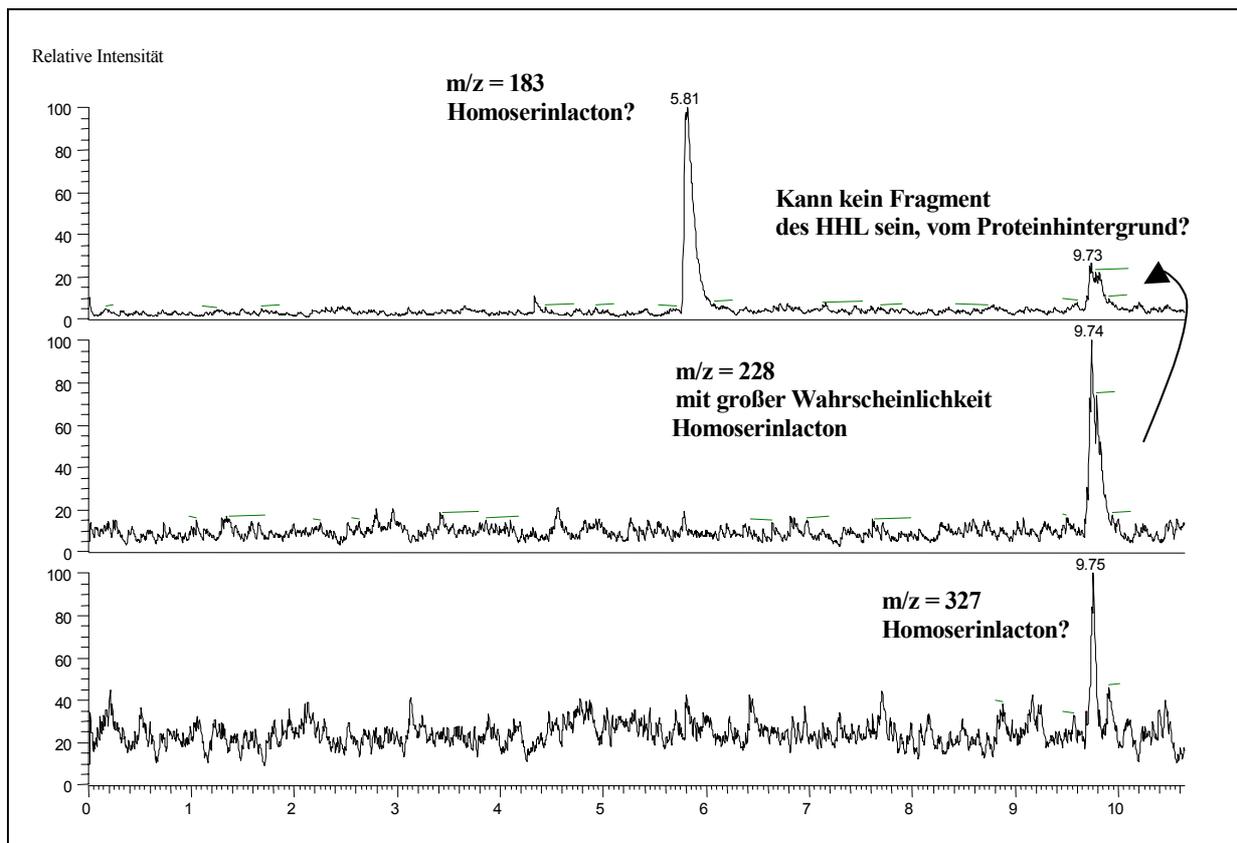


Abb. 66: CZE-ESI-MS, bei pH 4.5 von „Realprobe 1“, CE- und ESI-MS-Bedingungen: siehe Abb. 63

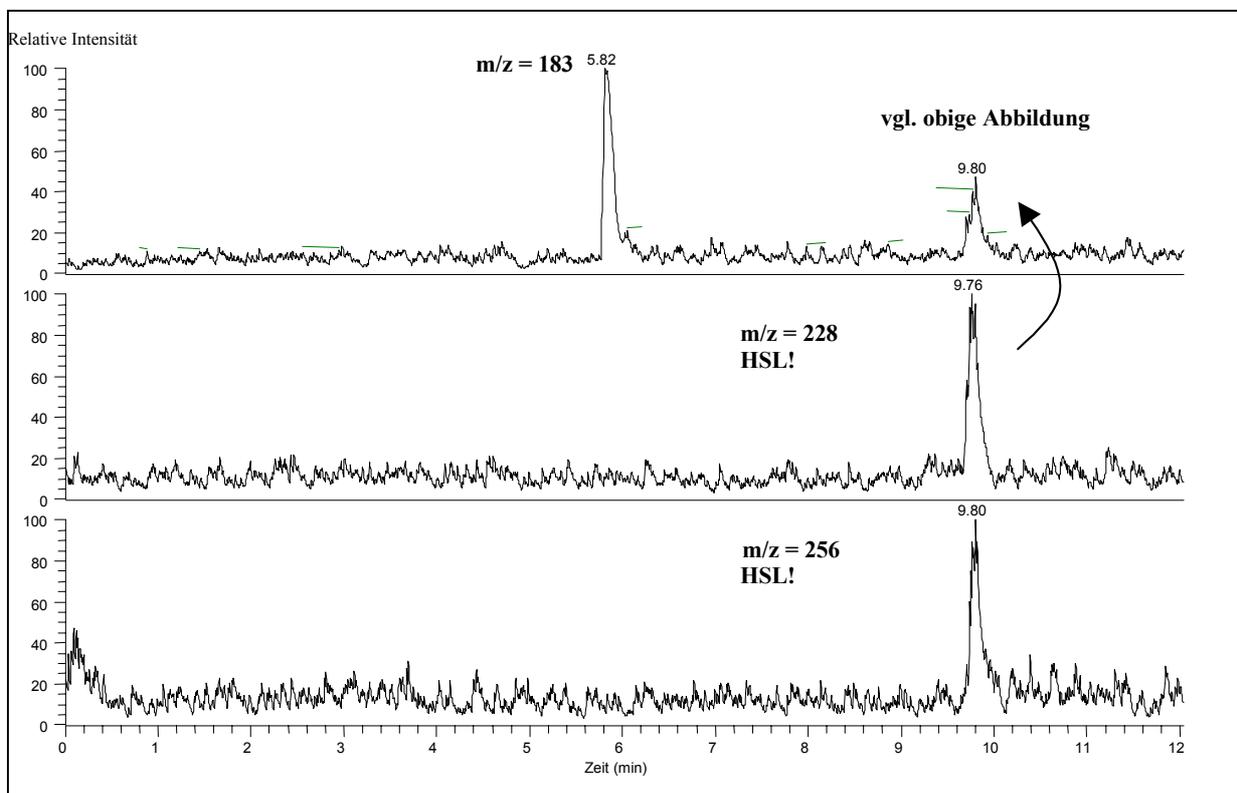


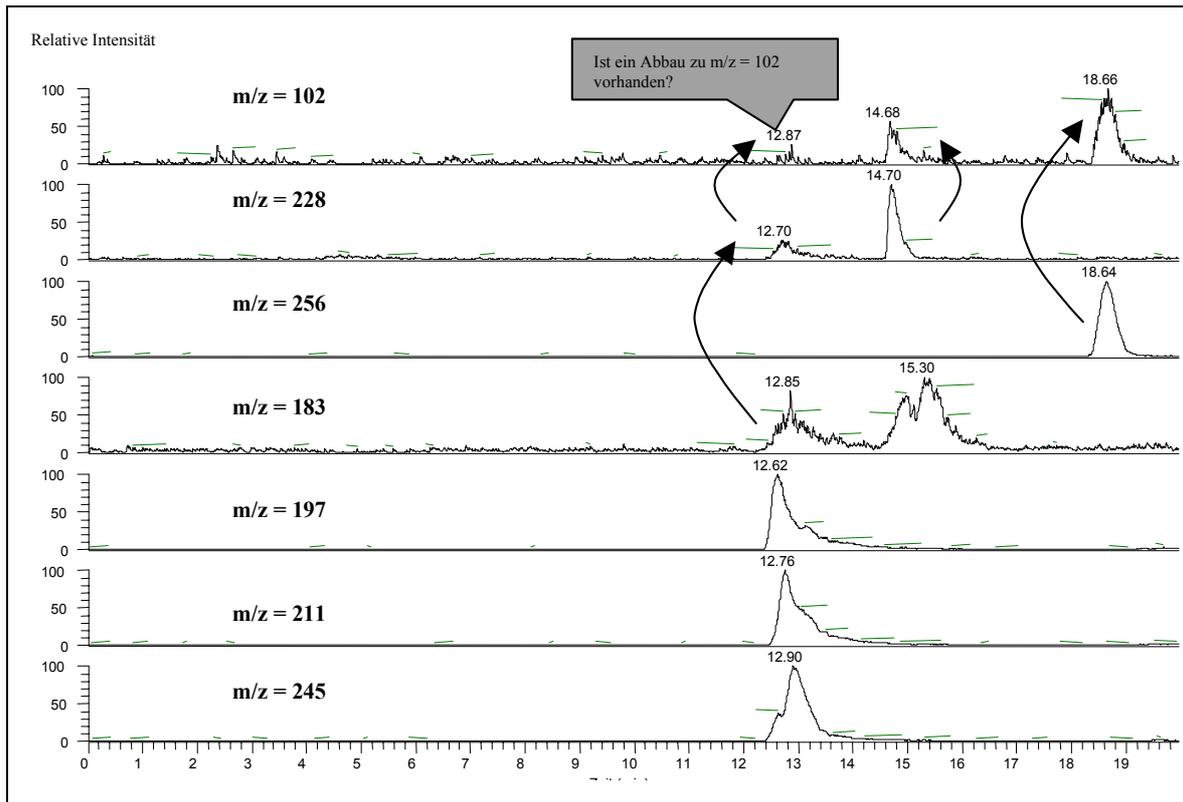
Abb. 67: CZE-ESI-MS, bei pH 4.5 von „Realprobe 2“, CE- und ESI-MS-Bedingungen: siehe Abb. 63

In der Realprobe 2 konnte neben  $m/z = 228$  noch  $m/z = 256$ , ebenso  $m/z = 183$  nachgewiesen werden (Abb. 67). Den beiden ersten Massen würden aufgrund der DC-Voruntersuchungen das Homoserinlacton OHL und DHL zugeordnet werden.

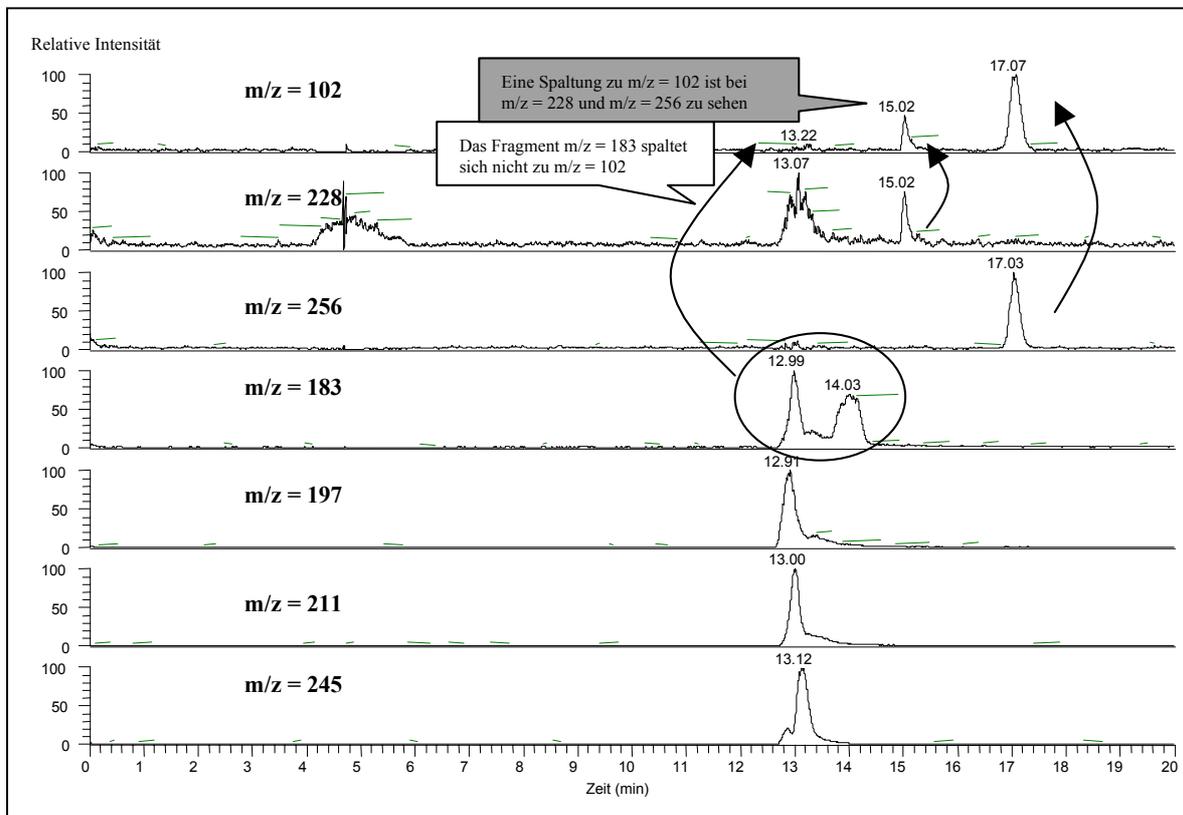
Die Messungen der Realproben 1 und 2 in CZE-ESI-MS dienten dem Screening, jedoch mußte für eine Trennung und damit eindeutige Identifizierung der Homoserinlactone die PF-MEKC-ESI-MS angewandt werden. Dabei wurde in dieser Weise verfahren, daß zunächst ein full-scan-Massenspektrum aufgenommen wurde unter Berücksichtigung der Massenspur  $m/z = 102$ . Im zweiten Schritt wurde während der Messung eine CID von 23% appliziert und dabei  $m/z = 102$  monitort (Abb 68 + 69). Jedoch konnte diese Bestätigungsmessungen für die Realprobe 1 nicht durchgeführt werden, da kein weiteres Material zu Messungen zur Verfügung stand.

In Abb. 68 ist das Massenspektrum der Realprobe 2 im full scan dargestellt. In der zweiten und dritten Spur wurden die oben beschriebenen Homoserinlactone angenommen. In der ersten Spur sah man  $m/z = 102$ , das unter den ESI-Bedingungen schon ohne collisionsinduzierte Fragmentierung aus den Homoserinlactonen entstand.

Bei Anwendung der CID (23 % relativer Energie; Abb. 69) wurde die Intensität des  $m/z = 102$ -Fragments erhöht, im Gegenzug die von  $m/z = 228$  und  $m/z = 256$  erniedrigt. Das deutete auf Homoserinlactone hin. Alle anderen Spuren zeigten, wie in Abb. 66 vermutet, keinen 102-Peak.



**Abb. 68:** Screening der Realprobe 2 in PF-MEKC-ESI-MS (ohne CID). Unter den gegebenen ESI-Bedingungen wurde  $m/z = 228$  und  $m/z = 256$  zu  $m/z = 102$  abgebaut. Für  $m/z = 183$  konnte das nicht eindeutig gesagt werden.



**Abb. 69:** Screening der Realprobe 2 in PF-MEKC-ESI-MS nach Anwendung von 23 % CID. Im Falle von  $m/z = 228$  und  $m/z = 256$  konnte ein Abbau zu dem charakteristischen Fragment  $m/z = 102$  beobachtet werden.

#### 4.4.4.6 Zusammenfassung und Ausblick

Es kristallisierte sich durch flow injection Messungen (CID) das Hauptfragment  $m/z = 102$  heraus, was schon in zuvor erschienenen Publikationen entdeckt wurde [Wood et al., 1997]. Mit  $m/z = 102$  konnten eindeutig die in Realproben vorhandenen Homoserinlactone identifiziert werden. Mittels PF-MEKC-ESI-MS war es möglich, drei Homoserinlactone OHL, DHL und HHL aufgrund ihrer Hydrophobizität zu trennen und im Massenspektrum nachzuweisen. In der SRM- Technik wurden die Standard-Homoserinlactone auf Basis der CE-ESI-MS-Parameter quantifiziert (nachweisbare Konzentrationen zwischen 0.08 ppm (HHL) und 0.5 ppm (HHL)).

CE-ESI-MS-Parameter wie sheath gas, sheath liquid und Abstand ESI-needle zu heated capillary beeinflussten die CE-ESI-MS-Trennung der Homoserinlactone.

Wie in vorausgegangenen Kapiteln gezeigt 4.3 ff, veränderte ein zu hoher sheath gas Fluß die Stabilität des Elektrospray erheblich, was sich deutlich auf die Signale und somit Bestimmung der Nachweisgrenzen auswirkte. Bei der Messung bzw. Quantifizierung der Homoserinlactone kristallisierte sich heraus, daß maximale Signale ohne sheath gas erhalten wurden.

Der Abstand ESI-needle zu heated capillary sowie der elektrische Kontakt unter Zuhilfenahme einer für die Substanzen optimalen sheath liquid-Mischung beeinflussten die Stabilität des Elektrospray erheblich.

Nur durch die Optimierung der CE-ESI-MS-Parameter konnte ein maximales und reproduzierbares Analytsignal erhalten werden.

Diese in diesen Kapiteln beschriebenen Ergebnisse zur Analytik der Homoserinlactone stellten erste Voruntersuchungen dar, die weiter ausgebaut und an weitere Realproben angewendet werden können. Nicht nur die PF- MEKC-ESI-MS wird Anwendung finden, in zukünftigen Untersuchungen sollte ebenso NACE-ESI-MS zur Analyse in Betracht gezogen werden.

## 5. Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick

### 5.1 Themenstellung und Ziel der Arbeit

Themenstellung der vorliegenden Arbeit war die Optimierung einer Kapillarelektrophorese-Elektrospray-Massenspektrometrie-Kopplung (CE-ESI-MS) zur Strukturidentifizierung und quantitativen Analyse von polaren, organischen Substanzen.

Angeregt wurden die Arbeiten durch eine zu Beginn durchgeführte Literaturrecherche über die Analyse von Agrochemikalien mittels Kapillarelektrophorese. Hierbei wurde das Augenmerk auf Artikel gerichtet, die im Zeitraum Mitte der 1990er bis 2000 veröffentlicht wurden. Eine Aktualisierung fand zum Schluß der experimentellen Arbeiten statt, indem repräsentative Publikationen eingefügt wurden.

Aus der Literaturrecherche kristallisierten sich hauptsächlich verwendete Analysemethoden (MEKC, PF-MEKC, NACE), Agrochemikalien (s-Triazine, Phenoxy Säuren u.a.) und Proben (dest. Wasser) sowie Realproben (Flußwasser, Lebensmittel, Böden) heraus.

Da die Nachweisgrenze der Kapillarelektrophorese um ca. 0.1-0.3 ppm (abhängig von der eingesetzten Methode) lag, war es wichtig, Aufkonzentrierungsmaßnahmen zur Anreicherung heranzuziehen. Dabei kamen hauptsächlich die Festphasenextraktion (SPE) als off-line Methode zum Einsatz, mit der es möglich war, die Grenzwerte der Trinkwasserverordnung zu erreichen (0.1 ppb für ein einzelnes Pestizid bzw. 0.5 ppb für die Summe von Pestiziden). Neuere Trends spiegelten on-line Methoden wider. Dazu zählte das sogenannte mizellare Sweeping, das sich an die Prinzipien der MEKC (siehe Abschnitt 3.1.2) anlehnte.

Im Rahmen dieser Arbeit war wichtig abzuklären, inwieweit eine Aufkonzentrierung im Sweeping (qualitativ und quantitativ) stattfand. Um einen weiten Bereich abdecken zu können, kamen Substanzen unterschiedlichster Hydrophobizität zum Einsatz. Zum direkten Vergleich wurde eine off-line SPE zur Aufkonzentrierung herangezogen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Methoden zur Analyse von ausgewählten Agrochemikalien mittels Kapillarelektrophorese zu entwickeln, die in einer späteren ESI Kopplung mit einem Massenspektrometrie übertragbar waren.

Die Optimierung der CE-ESI-MS-Kopplung, das Herausfinden und Gewichten wichtiger die Trennung beeinflussender Parameter stand im Mittelpunkt. Als Modellsubstanzen wurden s-Triazin-Herbizide verwendet.

Auf der Basis des optimierten CE-ESI-MS-Systems sollte ausgehend von ausgewählten Agrochemikalien die Anwendbarkeit auf andere organische Substanzen qualitativ sowie quantitativ untersucht werden. Die Auswahl der Analyten wurde u.a. durch mit anderen Partnerinstituten durchgeführten Kooperationen initiiert, um aktuelle Fragestellungen in CE-ESI-MS untersuchen zu können.

## 5.2 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

Für eine direkte Kopplung mit einem Massenspektrometer eignete sich die MEKC-Methode nicht aufgrund einer möglichen Kontamination der Ionenquelle und einer dadurch bedingten Reduzierung der Signalintensität.

Deshalb wurde die **sogenannte Partial filling Technik** angewandt, in der nur ein Teil des mizellaren Puffers injiziert wurde. Zunächst wurden in PF-MEKC (UV, ohne MS) wichtige die Trennung beeinflussende Parameter (qualitative wie pH-Wert des Puffers, Puffer-, SDS-Methanol – Konzentrationen und Mizellarzonenlänge sowie quantitative wie Reproduzierbarkeit, Nachweisgrenzen) anhand von 16 ausgewählten s-Triazinen untersucht. Die Nachweisgrenzen der 16 untersuchten s-Triazin-Herbiziden lagen für 7 Messungen zwischen 0.12 und 0.29 ppm. Neun aufeinanderfolgende Messungen zeigten in der Migrationszeit Abweichungen zwischen 0.71 und 1.1 RSD%, in effektiver Mobilität zwischen 0.8 und 1.8 RSD%. Die Flächenintegration in effektiver Mobilitätsskala unter Bezug auf einen internen Standard ließ Werte zwischen 1.1 – 3.0 % bzw. ca. 6% für Terbutryn erreichen, andere Integrationen (Zeitkorrektur in Migrationszeitskala bzw. effektive Mobilitätsskala) zeigten Werte bei ca. 2 – 5 %. Für weitere quantitative Messungen ist deshalb die Mobilitätstransformation unter Einbezug eines internen Standards zu empfehlen.

Ausgehend von der PF-MEKC (UV)- Methode zur Analytik von 16 s-Triazin-Herbiziden wurde schrittweise die **PF-MEKC-ESI-MS-Methode** auf der Basis von [Yang et al., 1997] entwickelt. Der in der UV-Methode verwendete Boratpuffer, pH 9.2 war für die Kopplung

ungeeignet, da aufgrund des schnellen EOF eine raschere Kontamination mit SDS eintrat als die Analyten aus der Kapillare austreten konnten.

Durch Konditionierung der Kapillare mit 0.1 M Salzsäure anstatt 0.1 M Natronlauge war es möglich, ausgewählte s-Triazine quantifizieren zu können, ohne eine Kontamination der Ionenquelle mit SDS zu verursachen. Mit 10 mM Ammoniumacetat, pH 6.0, 10 % Methanol (= BGE) und 10 mM Ammoniumacetat, pH 6.0, 20 mM SDS, 10 % Methanol (= mizellarer Puffer) konnten 14 s-Triazine bestimmt werden. Da Prometryn und Terbutryn unter diesen Bedingungen coeluierten, wurden sie zur Quantifizierung nicht herangezogen. Die Quantifizierung erfolgte im SIM (Single Ion Monitoring). Die Nachweisgrenzen lagen zwischen 0.31 und 1.5 ppm sowie bis 2.7 ppm. Die relative Standardabweichung bewegten sich zwischen 1.7 und 5.9 RSD%. Aufgrund dessen, daß zu dem Zeitpunkt der Messungen noch nicht alle den Elektrospray beeinflussende Parameter bekannt waren, war die Signalausbildung noch nicht optimal und somit die Nachweisgrenzen zu hoch.

In **NACE (UV)** wurden 10 Analyten untersucht (5 Hydroxytriazine und 5 Phenoxysäuren). Wie in PF-MEKC (UV) wurden qualitative als auch quantitative Parameter untersucht. Die Nachweisgrenzen lagen für 7 Messungen zwischen 0.16 und 26 ppm. 6 aufeinanderfolgende Messungen zeigten Abweichungen von 3.5 bis 4.3 RSD%. Durch Transformation in effektive Mobilitätsskala wurden Werte von 1.4 bis 2.0 % bei den Phenoxysäuren erreicht, bei den Hydroxytriazinen rangierte RSD% um 3.4 %. Nur bei den Phenoxysäuren war die integrierte Fläche in effektiver Mobilitätsskala um 1 %. Ähnliche Werte wurden für die Hydroxytriazine in effektiver Mobilitätsskala unter Einbezug eines internen Standards erhalten (1.3-1.8%). Die Reproduzierbarkeit der integrierten Peakfläche (Mobilitätsskala:  $\mu$ -Skala) verbesserte sich für Kationen und Anionen. Diese Transformation sollte für eine Quantifizierung von Anionen und Kationen in EOF-abhängigen Trennungen wie CZE, MEKC und NACE in Betracht gezogen werden [Menzinger et al., 2001]

**In der Aufkonzentrierung mittels Sweeping** wurden Analyten unterschiedlichster Hydrophobizität untersucht (s-Triazine; Phenylharnstoffe, PAH). Dabei kristallisierte sich heraus, daß unter Einbezug des molaren Absorptionskoeffizienten eine Normierung zum direkten Vergleich der quantitativen Daten für Substanzen mit unterschiedlichem Absorptionsmaximum möglich war. Innerhalb  $\log K_{OW}$  1.6 bis 3.8 war es möglich, eine lineare Beziehung zwischen  $\log K_{OW}$  und dem Kapazitätsfaktors aufzustellen. Über  $\log K_{OW}$

= 4 war keine Verbesserung des Aufkonzentrierungseffekt zu sehen, was in Kontrast zu der Überlegung stand, daß mit zunehmendem  $\log K_{OW}$  der Aufkonzentrierungseffekt zunahm. Unter  $\log K_{OW} = 1.6$  konnte keine lineare Beziehung gefunden werden, was am „Ansprechverhalten“ des Sweeping für Substanzen mit niedrigem  $\log K_{OW}$  lag. Innerhalb des linearen Bereich war eine Voraussage für Substanzen möglich; das wurde für Atraton, Ethofumesat und Alachlor getestet. Innerhalb des linearen Bereichs wurden [n=4] ca. 4 mM gefunden, was ca. 0.03-0.04 ppm entsprach.

Zum direkten Vergleich wurde eine SPE-offline-Methode zur Analytik von 16 s-Triazin-Herbiziden herangezogen. Abhängig von der untersuchten Matrix (gespiktes destilliertes bzw. Isarwasser) konnten ca. 0.03 – 0.17 und 0.25 bzw. größer 1 ppb nachgewiesen werden.

Sweeping war zwar eine einfache Methode – nur die Leitfähigkeit der Probe mußte auf die des Puffers eingestellt werden-, jedoch war der Bereich der Trinkwasserordnung nur mit SPE erreichbar. Die in der Literatur angegebene z.T. 5000 fache Aufkonzentrierung von Sweeping ergab sich nur durch einen unrealistischen Vergleich zwischen nicht aufkonzentrierter (ca. 200-400 ppm) und aufkonzentrierter Probe (0.2-0.4 ppm). In unseren Experimenten wurde unterhalb der Nachweisgrenze der CE gemessen, da dies als mehr praxisbezogen angesehen werden konnte. Eine Aufkonzentrierung oberhalb der Nachweisgrenze der CE war wenig sinnvoll. Sweeping konnte nicht direkt mit einem Massenspektrometer kombiniert werden aufgrund der unter MEKC beschriebenen möglichen Kontamination der Ionenquelle.

**Für Messungen von Analyten in CE-ESI-MS war entscheidend, welche Parameter die Trennung beeinflussten.** Nur durch Kenntnis aller Parameter war es möglich, maximale Analytsignale zu erhalten. Im folgenden soll anhand der Tabelle 31 klar gemacht werden, welche Effekte jedem einzelnen Parameter zuzuschreiben waren:

Parameter	Effekt
<p style="text-align: center;"><b>Sheath gas Fluß</b></p>	<div style="border: 1px solid black; width: fit-content; margin: 0 auto; padding: 2px; text-align: center;">Wässrige Systeme</div> <p style="text-align: center;">Messung im Negativmodus: ausgewählte organische Carbonsäuren</p> <p style="text-align: center;">Saugeffekt; Am größten für Substanzen mit kleiner elektrophoretischer Mobilität Abschwächen der Stärke des Saugeffektes mit zunehmendem pH-Wert Über 35 arb Inhomogenitäten im Elektrospray</p> <div style="border: 1px solid black; width: fit-content; margin: 0 auto; padding: 2px; text-align: center;">Nichtwässrige Systeme</div> <p style="text-align: center;">Messung im Positivmodus: ausgewählte Glykoalkaloide</p> <p style="text-align: center;">Saugeffekt Stärker als im Vergleich zum wässrigen System; Sprayinstabilitäten über 15 arb</p>
<p style="text-align: center;">Sheath liquid</p>	<p style="text-align: center;">Leitende Verbindung, maximale Sprayausbildung</p> <div style="border: 1px solid black; width: fit-content; margin: 0 auto; padding: 2px; text-align: center;">Messungen im Positivmodus:</div> <p style="text-align: center;">Methanol/Wasser/Ameisensäure: 50/49/1</p> <div style="border: 1px solid black; width: fit-content; margin: 0 auto; padding: 2px; text-align: center;">Messung im Negativmodus:</div> <p style="text-align: center;">Methanol/Wasser/Ammoniak/50/45/5</p> <p style="text-align: center;">Diese sheath Liquid ist auch verwendbar für Adduktverbindungen (Messung im Positivmodus)</p>

<p>Temperatur der heated capillary</p>	<p>Optimale Signalintensität:</p> <div data-bbox="868 300 1370 376" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: fit-content;"> <p>Weniger thermisch labile Substanzen:</p> </div> <p style="text-align: center;">s-Triazine: 150-160 °C, über 200 °C deutlicher Abbau</p> <div data-bbox="925 528 1313 604" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: fit-content;"> <p>Thermisch labile Substanzen:</p> </div> <p style="text-align: center;">Sulfonylharnstoffe, Adduktverbindungen: 100 °C weitere Erhöhung der Temperatur führte zum thermischen Abbau</p>
<p>Abstand ESI-needle zu heated capillary in Kombination mit Sprayspannung und CE- Kapillarenabstand</p>	<p>Modifiziertes ESI-Interface</p> <p>Modellsubstanzen: Ausgewählte s-Triazine</p> <div data-bbox="829 1088 1370 1164" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: fit-content;"> <p>CE-ESI-nozzle (50 µm I.D./360 µm O.D.)</p> </div> <p style="text-align: center;">5 mm, 4.8 ESI-kV (pH 4.5, 10 mM)</p> <div data-bbox="829 1258 1390 1357" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: fit-content;"> <p>HPLC-ESI-nozzle (50 mm I.D., 190 µm O.D.)</p> </div> <p style="text-align: center;">pH 6.8 (10 mM)</p> <p style="text-align: center;">3.5 mm, 3.6 ESI-kV 5.6 mm, 4 ESI-kV CE-Kapillarenabstand: 0</p> <p style="text-align: center;">pH 9.5 (10 mM)</p> <p style="text-align: center;">6.3 mm, 5.4 ESI-kV</p> <p style="text-align: center;">7.0 mm, 5.4 ESI-kV</p>

	deutlich höhere Signalintensitäten bei pH 9.5, größerer Abstand sowie ESI-Spannung notwendig
Kopplung zweier Kapillaren mit (gleichem bzw.) unterschiedlichem Innendurchmesser	<p>50-50-360-360 75-50-360-360 75-40-360-360 <b>50-40-360-360:</b> beste Ergebnisse: schwächere Beschleunigung der Migrationszeiten sowie EOF als bei 75-40-360-360;</p> <p>4.5 mm, 5.2 ESI-kV, 50-40-360-360: unterhalb Abstand von 4mm: erhöhte Signalintensität bei reduziertem Signal-Rausch-Verhältnis, Erhöhung S/N von ca. 25 (nicht gekoppelt) auf ca. 40, dennoch: Kapillarenkopplung ist für Messung nicht zu empfehlen, da sie leicht zu Verstopfungen neigt und deshalb exakt gereinigt werden muß.</p>

**Tab. 31:** Zusammenfassung wichtiger untersuchter CE-ESI-MS-Parameter: sheath gas, sheath liquid, Temperatur der heated capillary, Abstand ESI-needle zu heated capillary in Kombination mit Sprayspannung und CE-Kapillarenabstand, Kopplung zweier Kapillaren.

Nach Optimierung der CE-ESI-MS und Herausfinden der Parameter, die eine Trennung beeinflussten, wurden polare, organische Substanzen zur Anwendung der Optimierung herangezogen. Es handelte sich um **organische Carbonsäuren**, die sowohl im Negativmodus als negatives Quasimolekülion als auch im Positivmodus als positives Addukt nachgewiesen werden konnten. Weiterhin wurde die CIS-MS für ausgewählte Substanzen (**1 S-Triazin, 1 Homoserinlacton, 1 Phenylharnstoff und 1 Glykoalkaloid**) getestet.

Die Photoprodukte dreier ausgewählter **Sulfonylharnstoffe (Triasulfuron, Oxasulfuron und Thifensulfuron)** wurden in der CE-ESI-MS näher charakterisiert. **Homoserinlactone (HHL, DHL und OHL)** wurden in der CE-ESI-MS bzw. PF-MEK-ESI-MS qualitativ und quantitativ untersucht. Im folgenden eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.

**Adduktverbindungen** aus organischen Carbonsäuren und dem Kation des Puffers konnten im Positivmodus als  $[M+NH_4]^+$  nachgewiesen werden. Dies wurde zunächst in flow injections getestet. Dabei fiel auf, daß die räumliche Nähe zweier Carboxygruppen zur Adduktbildung eine wichtige Voraussetzung war.

Im Positivmodus wurde zunächst der Abstand der ESI-needle zur heated capillary optimiert (7.1 mm und 5.4 ESI-kV, sheath gas = 0, heated capillary: 100 °C) einem 20 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 10.1 wurden drei ausgewählte organische Carbonsäuren quantifiziert (Phthalsäure, 1,2,4-Benzentricarbonsäure und 1,2,4,5-Benzentetracarbonsäure: 9.1, 15.9 und 28.3 ppm). Es fielen die relativ hohen Nachweisgrenzen auf, die für eine quantitative Analytik ungeeignet erschienen. Zum Vergleich wurde im Negativmodus eine Optimierung bei 170 °C, 3.7 mm und 3.6 ESI-kV vorgenommen. Die als negative Quasimolekülonen gemessenen korrespondierenden Säureanionen wurden zwar detektiert, aber während den Messungen wurde zur Stabilisierung des Elektrosprays ein hoher sheath gas Fluss gebraucht.

Insgesamt gesehen könnte die Messung der Addukte im Positivmodus als auch die der korrespondierenden Säureanionen im Negativmodus zur Screening-Analytik von Verbindungen durchgeführt werden, die leicht Addukte mit Ammonium bilden. Somit wäre ein direkter Vergleich der Addukte und der Anionen möglich. Zusätzlich müsste auf eine ausreichend hohe Konzentration der Analyten geachtet werden.

Mit der **Koordinationskomplexierung** konnte gezeigt werden, dass OHL, Desethylatrazin und Monuron bei erhöhter Temperatur der heated capillary  $\pi$ -Komplexe mit Silberionen bildeten, während  $\alpha$  - Chaconin nicht komplexierte. Demnach war  $\alpha$  - Chaconin für CIS-MS nicht geeignet.

Für Desethylatrazin wurde ein CIS-MS-Lauf unter Anwendung von Hochspannung durchgeführt, wobei ein hoher sheath gas Fluß, aber eine geringe Sprayspannung notwendig waren.

Die Vorteile der Koordinationskomplexierung lagen in der leichten Komplexierbarkeit von aromatischen Systemen ( $\pi$  - Komplexe) mit Silberionen bei erhöhter Temperatur der heated

capillary. Dies kann/konnte genutzt werden, um strukturelle (Bindungs)-Informationen von Molekülen zu bekommen.

Die Nachteile der CIS-MS lagen in der Anwendbarkeit. Nicht alle Substanzklassen waren mit ihr bestimmbar. Ein aromatisches  $\pi$  - System mußte vorliegen. Da nicht nur ein Silberkomplex ein und desselben Moleküles entstand, sondern auch Komplexe von verminderter Intensität, war eine quantitative Analyse nur schwer zugänglich. Zudem führte Silber zu einer Kontamination der heated capillary und der Skimmerlinse (vgl. Abschnitt 6.2.2 ff), so dass diese oft gereinigt werden mussten.

**Sulfonylharnstoffe (Oxasulfuron, Triasulfuron und Thifensulfuron)** wurden in MS-MS-Experimenten näher charakterisiert. Es fiel auf, daß bevorzugt, eine  $\alpha$ -Spaltung der Carbonylgruppe der Harnstofffunktion auftrat.

Diese drei Sulfonylharnstoffe wurden dem Suntest (Photoabbau) für 10 bzw. 22 Stunden unterworfen. Die dabei gebildeten Metabolite wurden aus der Hauptfraktion mittels MS-MS identifiziert. Es fiel auf, daß Oxasulfuron die wenigsten und Thifensulfuron die meisten Fragmente während der Bestrahlung bildeten. Die identifizierten Metabolite wurden in CZE-ESI-MS bei zwei unterschiedlichen pH-Werten (pH 3.6 und pH 9.05) auf der Basis der optimierten ESI-MS-Bedingungen getrennt. Für die Identifizierung wurden diese pH ausgewählt, um eventuell saure bzw. alkalische Metabolite in der CE voneinander trennen zu können.

Die PF-MEKC-ESI-MS war aufgrund der schwachen Hydrophobizität der Standardsubstanzen für eine Analytik nicht geeignet.

**Homoserinlactone (HHL, OHL und DHL)** wurden MS/MS-Experimenten unterworfen, wobei sich das charakteristische Hauptfragment  $m/z = 102$  herauskristallisierte.

Eine Trennung der Homoserinlactone war in CZE-ESI-MS nicht möglich. Da sich aber die Hydrophobizitäten der AHL-Moleküle deutlich unterschieden, war eine anschließende Trennung in PF-MEKC-ESI-MS möglich. Nachweisgrenzen konnten im Single Reaction Monitoring (SRM) auf Basis der optimierten CE-ESI-MS-Bedingungen zwischen 0.08 und 0.5 ppm erhalten werden.

Zwei Realproben, die AHL-Moleküle enthielten wurden in CZE-ESI-MS getrennt. Neben dem starken Hintergrund (Proteine und andere Substanzen aus der Extraktion) wurden OHL bzw. OHL und DHL gefunden. Zur Absicherung wurde die Realprobe zwei in PF-MEKC-ESI-MS getrennt (von Realprobe 1 war zu diesem Zeitpunkt keine Substanz mehr vorhanden). Anschließend erfolgte während der Trennung eine collisionsinduzierte Fragmentierung. Die zuvor vermuteten AHL-Moleküle konnte auf diese Weise durch Zunahme des  $m/z = 102$  – Peaks eindeutig identifiziert werden.

### 5.3 Ausblick

Durch Kenntnis aller eine CE-ESI-MS Trennung beeinflussende Parameter war es möglich, die qualitative und quantitative Analytik ausgewählter polarer, organischer Substanzen zu maximieren. Im Hinblick auf die Elektrospray-kompatiblen Trenntechniken konnte u.a. gezeigt werden, daß PF-MEKC für die Analyse von ausgewählten s-Triazin-Herbiziden ebenso wie der Einsatz nichtwässriger Puffer (NACE) für die Analytik von Glykoalkaloiden im ESI möglich war, ohne durch nichtflüchtige Pufferbestandteile die Ionenquelle zu kontaminieren

Mit beiden Systemen (PF-MEKC-ESI-MS, NACE-ESI-MS) war eine Analytik von Substanzen unterschiedlicher Polarität möglich. In PF-MEKC konnten Substanzen aufgrund ihres unterschiedlichen Hydrophobizitätsverhaltens getrennt werden. Das nichtwässrige Medium machte sich das veränderte Säure-Base-Verhalten von Substanzen zu Nutze. Auch im Wässrigen aufgrund von z.B. Löslichkeitsproblemen nicht analysierbaren Stoffen konnten im NACE bestimmt werden.

Durch den Einsatz des offenen, visuell kontrollierbaren ESI-Systems [Schmitt-Kopplin, 2002] konnte eine deutliche Verbesserung in der Überprüfung der Elektrospraystabilität für die Analytik erreicht werden. Das war von entscheidendem Vorteil für die Optimierung der einzelnen Parameter, die eine CE-ESI-MS-Trennung beeinflussten. Nach Optimierung konnten schnell und präzise die Bedingungen eingestellt werden, die für eine Analytik im PF-MEKC- bzw. NACE-ESI-MS notwendig waren.

Im Hinblick auf weitere Arbeiten in diesem Bereich wäre interessant, inwieweit das ESI-System miniaturisiert werden könnte. Hätte das einen Einfluß auf die Signalintensität und einer damit verbundenen Reduzierung der Nachweisgrenzen?

Das Ziel sollte sein, die Reproduzierbarkeit des Elektrosprays weiter zu erhöhen, um den Baustein für den Einzug in die Reige der Routinetechniken (GC, HPLC, GC-MS, HPLC-MS) zu legen.

## 6. Anhang

### 6.1 Chemikalien

#### 6.1.1 Lösungsmittel

Acetonitril Supra Solv.....	Merck
Ammoniak 25 %ig, p. A.....	Merck
Ameisensäure p.A. ....	Merck
1-Butanol für die Chromatographie.....	Merck
Methanol Supra Solv.....	Merck

#### 6.1.2 Substanzen zum Herstellen von Pufferlösungen, Tensiden

Ammoniumcarbonat, chem. Rein, Pulver, DAB 6.....	Riedel de Haen
Ammoniumacetat, 98%.....	Aldrich
Borsäure.....	Merck
Natriumacetat, reinst.....	Merck
Natriumhydroxid Plätzchen, p.A.....	Merck
BBMA.....	Geschenk von Prof. Dr. Shigeru Terabe
Natriumdodecylsulfat (SDS), electrophoresis purity reagent.....	Bio Rad

#### 6.1.3 Standardsubstanzen

##### s-Triazine:

Ametryn, Atraton, Atrazin, Hydroxyatrazin, Desethylatrazin, OH-desethylatrazin, Desisopropylatrazin, Prometryn, Propazin, Hydroxypropazin, Sebuthylazin, Simazin, Hydroxysimazin, Terbuthylazin, Terbutryn, Hydroxyterbuthylazin.....	Riedel de Haen/ Ehrenstorfer
--	---------------------------------

Phenoxysäuren, Bentazon:

2,4-D, Dichlorprop, Mecoprop, MCPA, Bentazon.....Riedel de Haen/  
Ehrenstorfer

Phenylharnstoffe, Alachlor, Ethofumesat, Imidacloprid

Isoproturon, Linuron, Metoxuron, Monuron,  
Alachlor, Ethofumesat, Imidacloprid..... Riedel de Haen/  
Ehrenstorfer

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe:

Benzo[a]pyren (B[a]P), Dibenz[a,h]anthracen, Fluoranthen (FLA),  
Fluoren (FLU).....Ehrenstorfer

Organische Carbonsäuren:

Benzoessäure, Phthalsäure und weitere in Kapitel 4.4.1f  
beschrieben..... Merck  
1,2,4-Benzentricarbonsäure, 1,2,4,5-Benzentetracarbonsäure.....Sigma Aldrich

Sulfonylharnstoffe:

Oxasulfuron, Triasulfuron, Thifensulfuron..... Sigma Aldrich

Homoserinlactone:

N-Decanoyl-L-Homoserinlacton (DHL), N-Hexanoyl-L-Homoserin-  
lacton (HHL), N-Octanoyl-L-Homoserinlacton (OHL).....Sigma Aldrich

## 6.2 Apparativer Aufbau der CE-ESI-MS-Kopplung

### 6.2.1 Die Kapillarelektrophorese Beckman P/ACE 5510

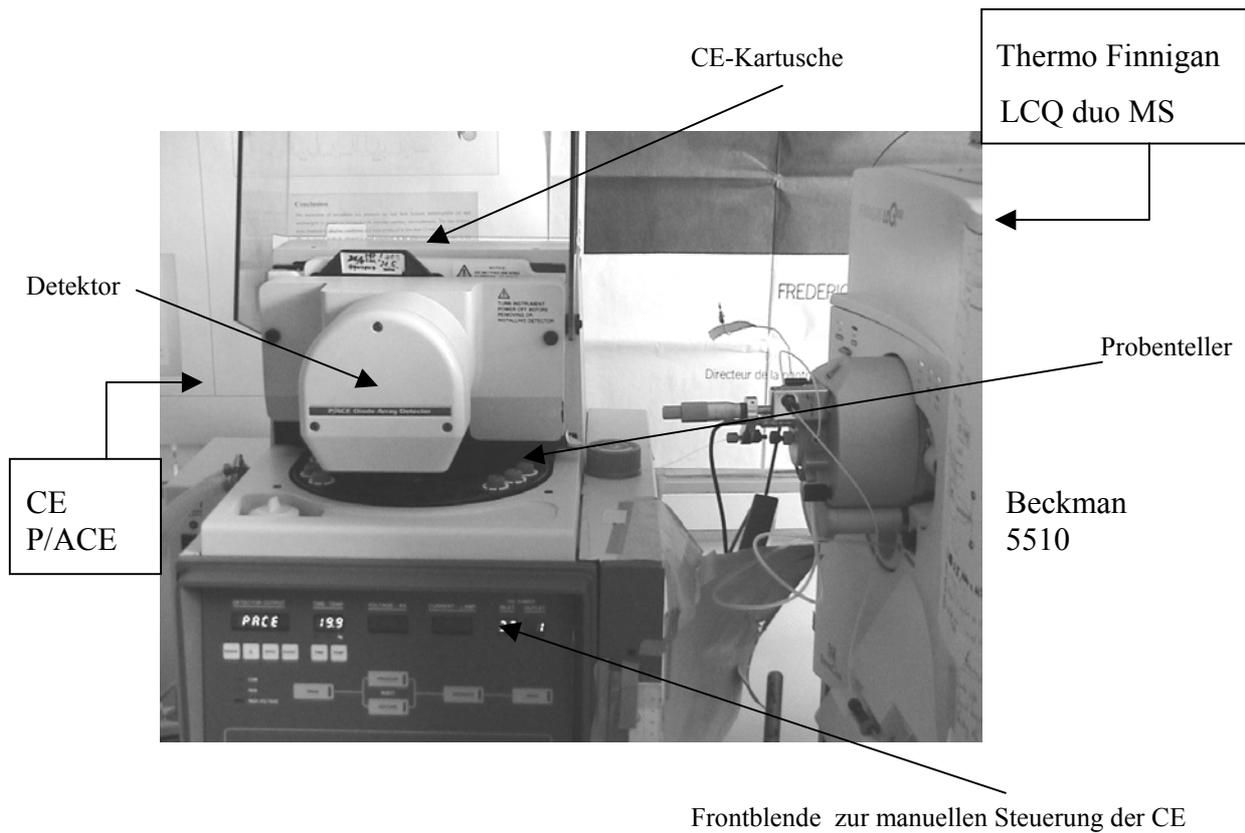
Die verwendete Kapillarelektrophorese stellte ein P/ACE 5510 der Firma Beckman mit „Diode array detection“, kurz DAD dar; die installierte Software war eine Beckman P/ACE 5510 Station, Version 1.2.

Die Probeninjektion erfolgt in den meisten Fällen hydrodynamisch. Unter dem Einfluß von Hochspannung wandern die Probenmoleküle innerhalb der Kapillare (siehe Meßprinzipien der Kapillarelektrophorese, Abschnitt 3.1). Wenn die Analyten das Detektionsfenster erreicht haben, registriert der DAD ein Signal (eine Spannung, die proportional zur Probenabsorption ist), das zu einem Computer geleitet wird. Das Signal wird schließlich graphisch in Form eines Elektropherogramms ausgegeben.

Die Hauptkomponenten der P/ACE 5510 Serie bestehen aus einem sog. Probenteller (zwei rotierende Teller), worin sowohl Puffer-, Probengefäße als auch Gefäße für andere Flüssigkeiten (z.B. Natronlauge zur Konditionierung) Platz finden, einer Halterung für die CE-Kartusche, einer Hochspannungsversorgung und Platinelektroden, einer optischen Einheit und Detektor, einer Temperaturregeleinheit, einem einfachen Injektionsmechanismus sowie einer Frontblende mit der Möglichkeit zur manuellen Steuerung des CE-Gerätes. (Abb. 70).

Die UV Kapillarkartusche beinhaltet die Quarzglaskapillare (i.d.R. 50 µm I.D. und 360 µm O.D.), in der ein kleiner Teil der Polyimidschicht entfernt wurde, wobei an dieser Stelle ein optisch transparenter Teil entstanden ist. Dieser transparente Teil wird innerhalb der Kartusche so befestigt, daß ein permanenter Kontakt zu der Öffnung der Detektoroptik möglich ist.

Die Kühlflüssigkeit zirkuliert innerhalb der Kartusche und temperiert sie auf eine konstante einstellbare Temperatur.



**Abb. 70:** Kopplung Beckman CE mit Thermoquest Finnigan LCQ duo via ESI-Interface (Original),

Die Hochspannungsversorgung kann maximal 30 kV bei 250  $\mu$ A anlegen; der Spannungsbereich liegt zwischen 1.0 und 30 kV, einstellbar in 100 V Schritten; der Strom („current“) kann zwischen 1.0 und 250  $\mu$ A eingestellt werden, in 0.1  $\mu$ A Schritten.

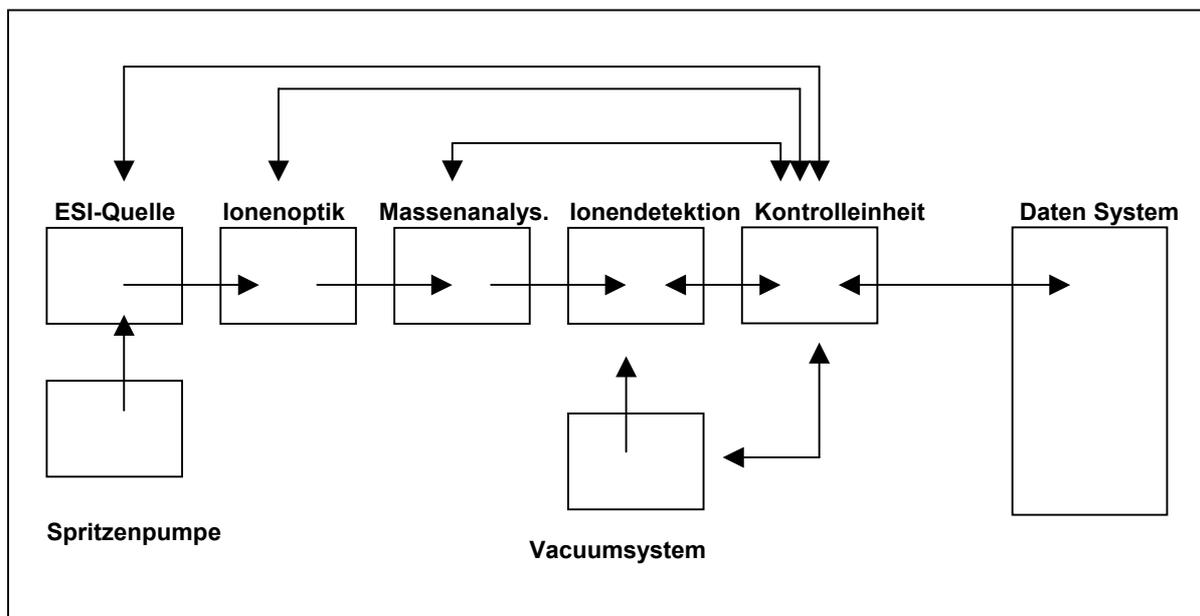
Der Detektor (DAD) deckt einen Bereich von 190 bis 670 nm ab. Die UV-Quelle ist eine Deuteriumlampe.

## 6.2.2 Das Massenspektrometer Thermo Finnigan LCQ duo

Ein Massenspektrometer (MS) ist prinzipiell eine Vorrichtung, in der a) Proben ionisiert, b) die resultierenden Ionen nach der Masse getrennt und c) diese Ionen detektiert werden.

Das MS nutzt eine Quadrupol - Ionenfalle mit einer Ionenquelle, die sich außerhalb des MS befindet. Das LCQ duo MS besteht aus einer sog. API source (API = Atmospheric pressure ionisation), Ionenoptik, einer Quadrupol - Ionenfalle und einem System zur Detektion der

Ionen (Abb. 71). Das LCQ duo MS scannt sowohl im MS- als auch im MS/MS- Modus; weiterhin sind Full -, SIM-, SRM- und Zoom - Scan - Einstellungen möglich.

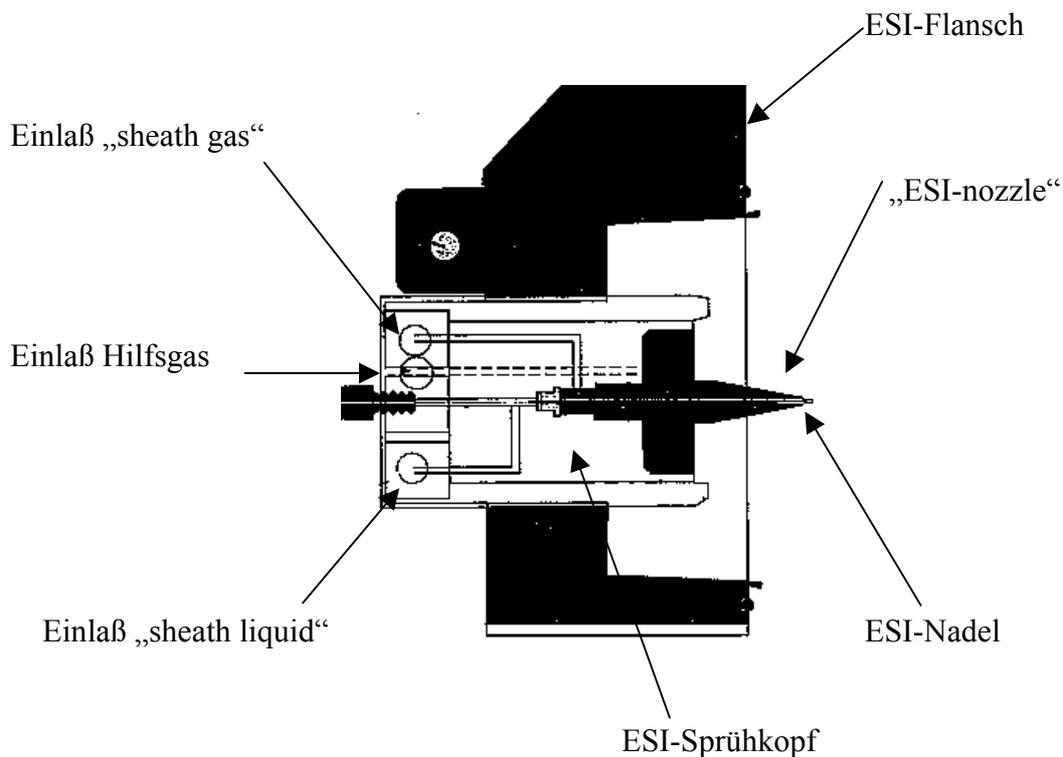


**Abb. 71:** Schematische Darstellung eines MS-Systems

### 6.2.2.1 Ionisation bei Atmosphärendruck (API-Quelle)

Die Elektrospray-Ionisation findet bei Atmosphärendruck statt. Für eine detaillierte Beschreibung der Theorie des Elektrospray-Prozesses wird auf Kapitel 3.3 verwiesen. Diese Ionisationstechnik produziert Ionen mit unterschiedlichem Ladungszustand. Darausfolgend kann ein Massenspektrum verschiedene Peaks für Ionen derselben Masse ergeben.

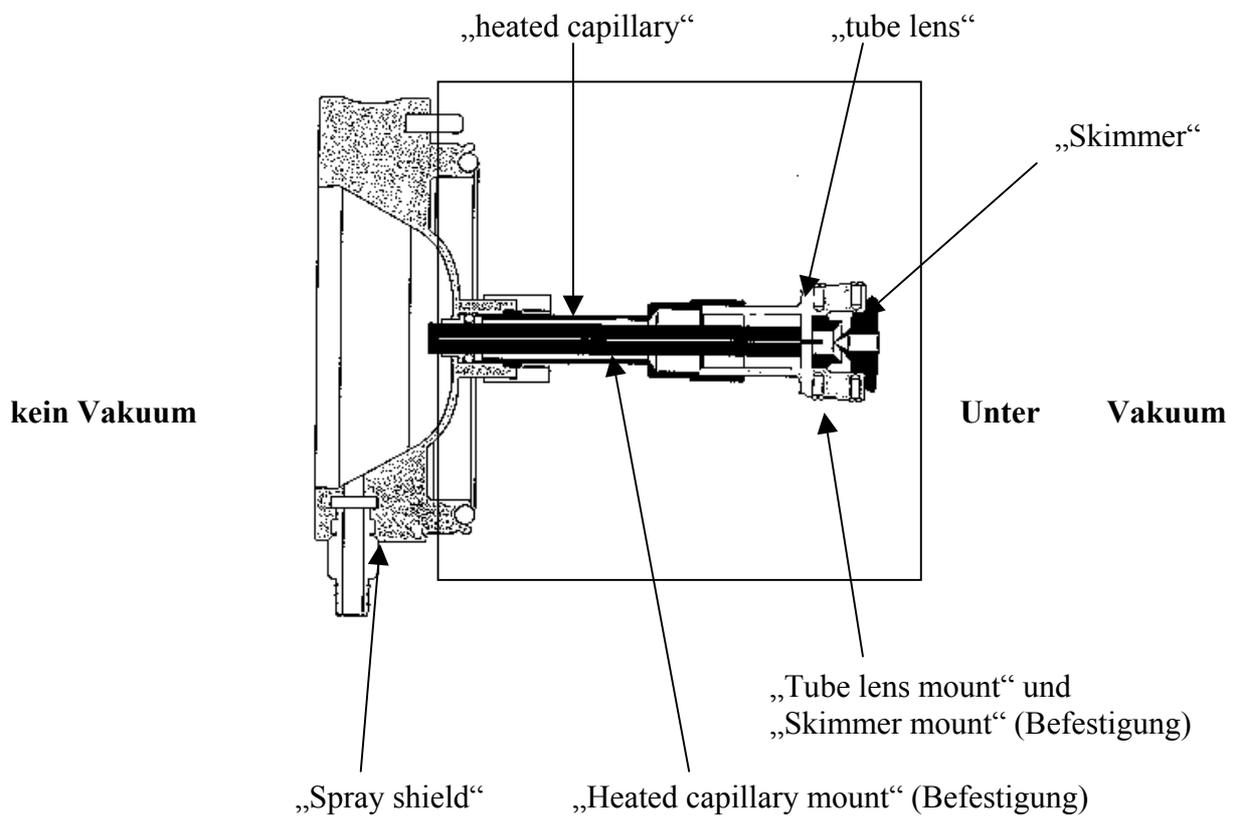
Die ESI-Quelle beinhaltet den ESI - Flansch, eine Vorrichtung, die den ESI-Sprühkopf direkt vor der heated capillary platziert, die Teil des sogenannten API - Stack ist. Der ESI-Sprühkopf beinhaltet „ESI-nozzle“ und ESI-Nadel („ESI-needle“) (Abb. 72). Die ESI-Nadel ist eine Metallnadel, an der eine Negativ - oder Positiv - Hochspannung angelegt werden kann, typischerweise zwischen  $\pm 3$  und  $\pm 5$  kV. Einlässe für „sheath gas“, „Hilfsgas“ und „sheath liquid“ sind am Sprühkopf angebracht.



**Abb. 72:** ESI-Flansch mit den dazugehörigen Bauteilen

### 6.2.2.2 „API-stack“

Der „API-stack“ besteht aus „spray-shield“, „heated capillary“, „tube lens“, „skimmer“ und „heated capillary mount“ sowie „tube lens mount“ und „skimmer mount“ (Abb. 73).



**Abb. 73:** Aufbau eines „API-stack“.

Die folgende Tabelle 32 faßt die Funktionen der wichtigsten, oben dargestellten Bauteile des „API-stack“ zusammen (nachfolgende Seite):

Bestandteil des „API-stack“	Kurze Beschreibung der Funktion
„Spray shield“	Nimmt ESI-Flansch auf: „Andocken“
„heated capillary“	Beheizbar bis 300 °C, unterstützt Desolvatisierung der Ionen, $\pm 25$ V: damit Ionen nicht an der Innenwand entladen werden
„tube lens“	„Tor“ für Ionen, die in den Massenanalysator gelangen, Fokussierung der Ionen auf dem Weg zum Skimmer, Trennung neutraler Partikel von Ionen
„Skimmer“	Trennt Skimmer-Region (ca. 1 Torr) von Okatapolregion ( $1 \cdot 10^{-3}$ Torr), Zur Verhinderung von Detektorschwankungen: Reduzierung großer geladener Partikel, die in Okatapolregion kommen können

Tab. 32: Beschreibung der wichtigsten Bauteile des „API-stack“.

### 6.2.2.3 Ionoptik

Im folgenden eine Querschnittsansicht von der Ionoptik (Abb. 74)

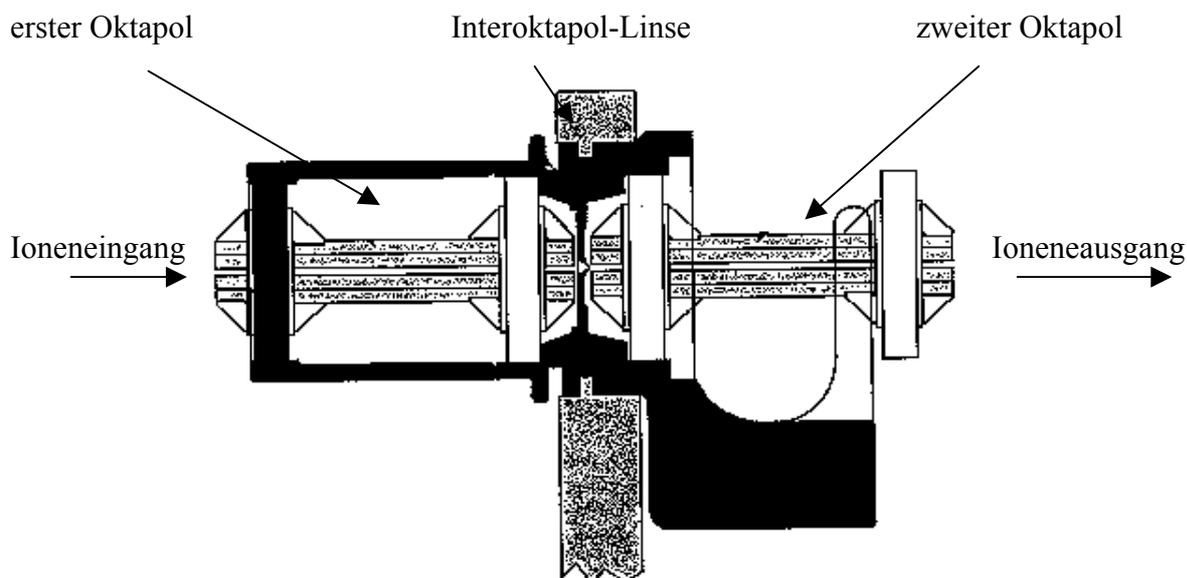
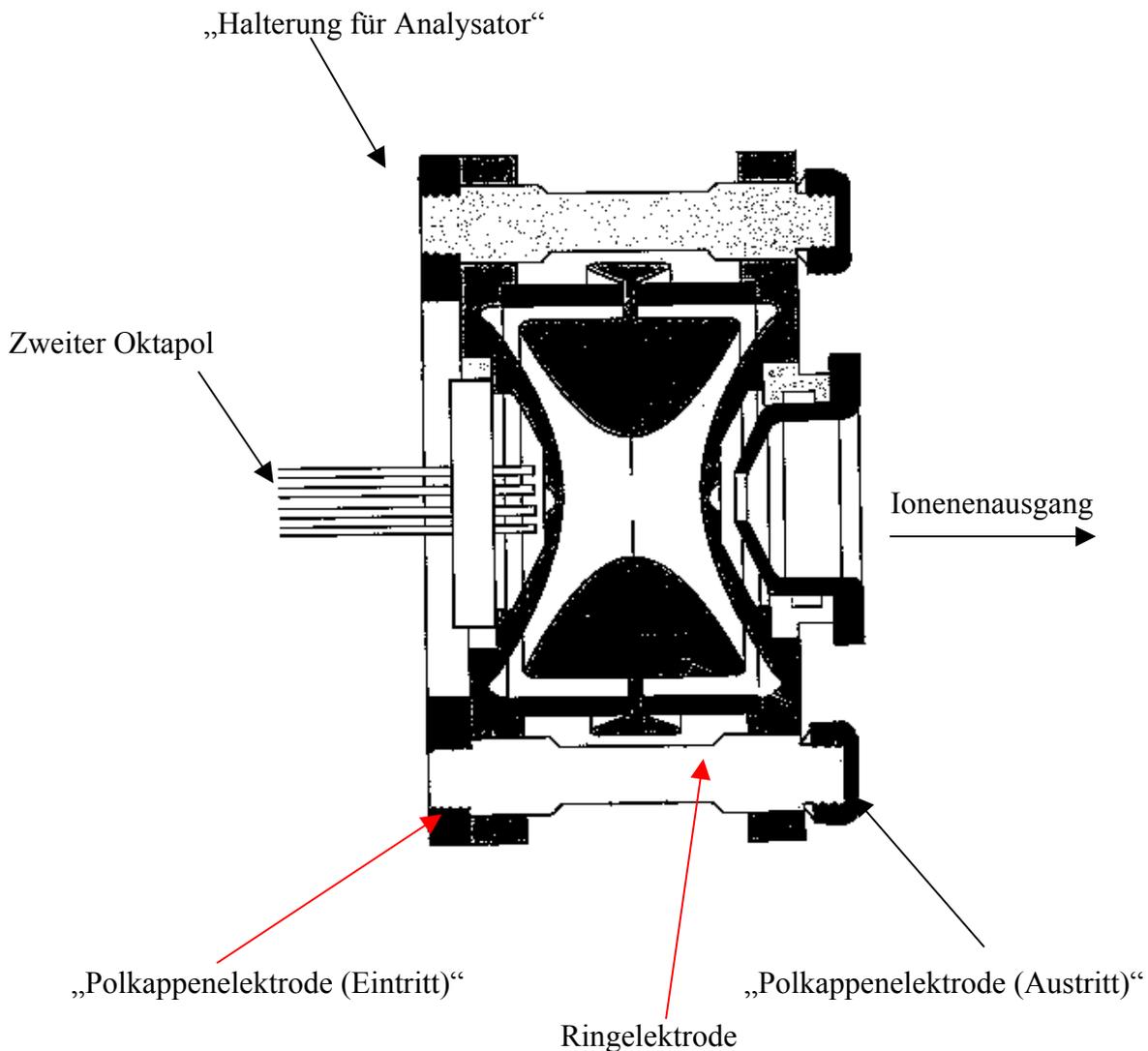


Abb. 74 Querschnitt durch Ionoptik

Die Ionenoptik fokussiert und transportiert die Ionen vom „API-stack“ zum Massenanalysator. Die Ionenoptik fungiert auch als „Ionen-Begrenzer“. Die Ionen werden aufgrund der Applikation von verschiedenen, überlagerten Spannungen auf einer Bahn durch die Oktapole geleitet.

#### 6.2.2.4 Massenanalysator und Detektion der Ionen

Der Massenanalysator trennt Ionen entsprechend der Masse pro Ladung ( $m/z$ ). Die folgende Abbildung 75 gibt einen Überblick über den Massenanalysator.



**Abb. 75:** Aufbau des Massenanalysators

Durch Anlegen von Spannungen an die zentrale Ringelektrode relativ zu den beiden Polkappenelektroden entsteht ein dreidimensionales, symmetrisches „Quadrupol-elektrisches Feld“. Innerhalb dieses Feldes können sich ausgewählte Ionen mit entsprechender  $m/z$  aufhalten. Wenn eine bestimmte Spannung erhöht wird, werden die Ionenbahnen instabil. Diese werden den Massenanalysator verlassen und gelangen in die Konversionsdynode und dem Elektronenvervielfacher.

Innerhalb des Massenanalysators sind MS-MS-Experimente möglich (CID). In der collisionsinduzierten Fragmentierung kollidieren neutrale Atome (Helium) und produzieren dadurch (schnelle) Projektilionen. Diese treffen auf die Analyt-Ionen und dissoziieren zu Fragmentionen.

#### 6.2.2.5 Vakuumsystem

Das LCQ duo Vakuumsystem evakuiert den in Abb. 73 markierten Teil des „API-stack“, Ionenoptik, Massenanalysator und Detektionssystem.

Drei verschiedene Regionen werden unterschieden:

##### **Vakuumregion**

„Heated capillary-Skimmer-Region“

erste Oktapolregion

Massenanalysator-Region

##### **Druck**

1 Torr („Rotary vane“-Pumpe)

$10^{-3}$  Torr (Turbomolekularpumpe)

$10^{-5}$  Torr (Turbomolekularpumpe),  
mit Helium als Dämpfungsgas

### 6.2.3 Vergleich Original-ESI-Interface mit modifiziertem ESI-Interface

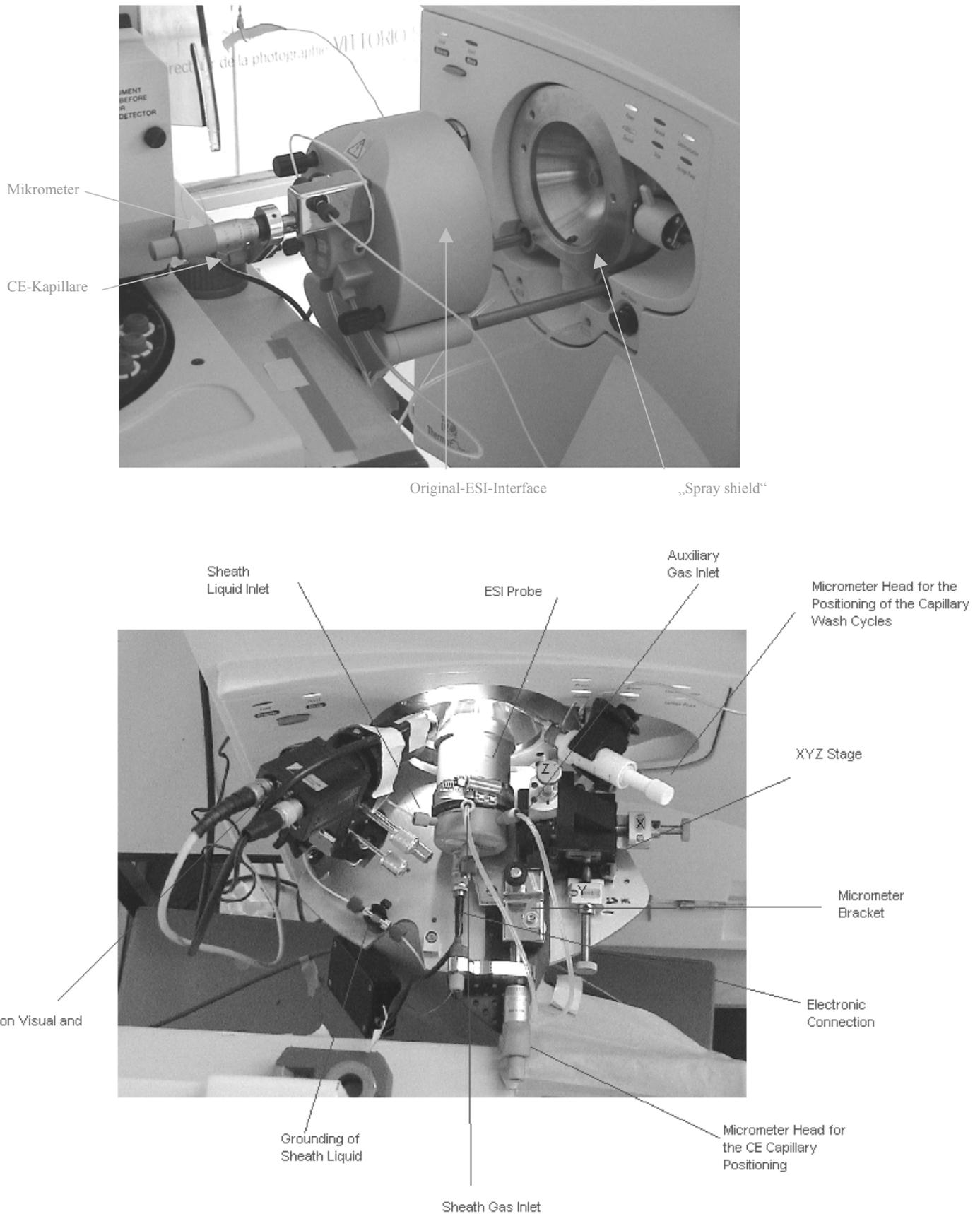
Der CE-ESI-MS-Adapter für die Thermoquest Finnigan LCQ duo Quelle wurde von Thermoquest Finnigan, San Jose, USA bezogen und im Juni 2000 installiert (Abb. 76, oben). Das modifizierte ESI-Interface wurde im Juli 2001 entwickelt [Schmitt-Kopplin, 2002] (Abb. 76, unten).

Der wesentliche Unterschied zwischen Original- und ESI-Interface war die direkte Visualisierung des Elektrosprays und die exakte Justierung der ESI-Nadel vor der heated capillary.

Auf einer Nanospray-Platte (Picoview, New Objectives, Cambridge, USA) wurde eine kleine **mobile Platte** angebracht, die den Elektrospray-Kopf mit ESI-Nadel, ESI-nozzle, Gasanschlüsse und Sheath liquid-Kanal aufnahm. Der Elektrospray-Kopf wurde unverändert dem Originalinterface entnommen.

Mit einer CCD-Kamera und Monitor war eine direkte Beobachtung der Vorgänge an ESI-Nadel und heated capillary möglich. Wichtig war die y-axiale Verstellung des ESI-Spraykopfes relativ zur heated capillary, um einen reproduzierbaren und stabilen Spray gewährleisten zu können. Dies ist mit einer **beweglichen Einheit** machbar, die direkt mit dem ESI-Spraykopf verbunden war. Diese Konfiguration erlaubt die Verstellung in x-, y- und z-Achse.

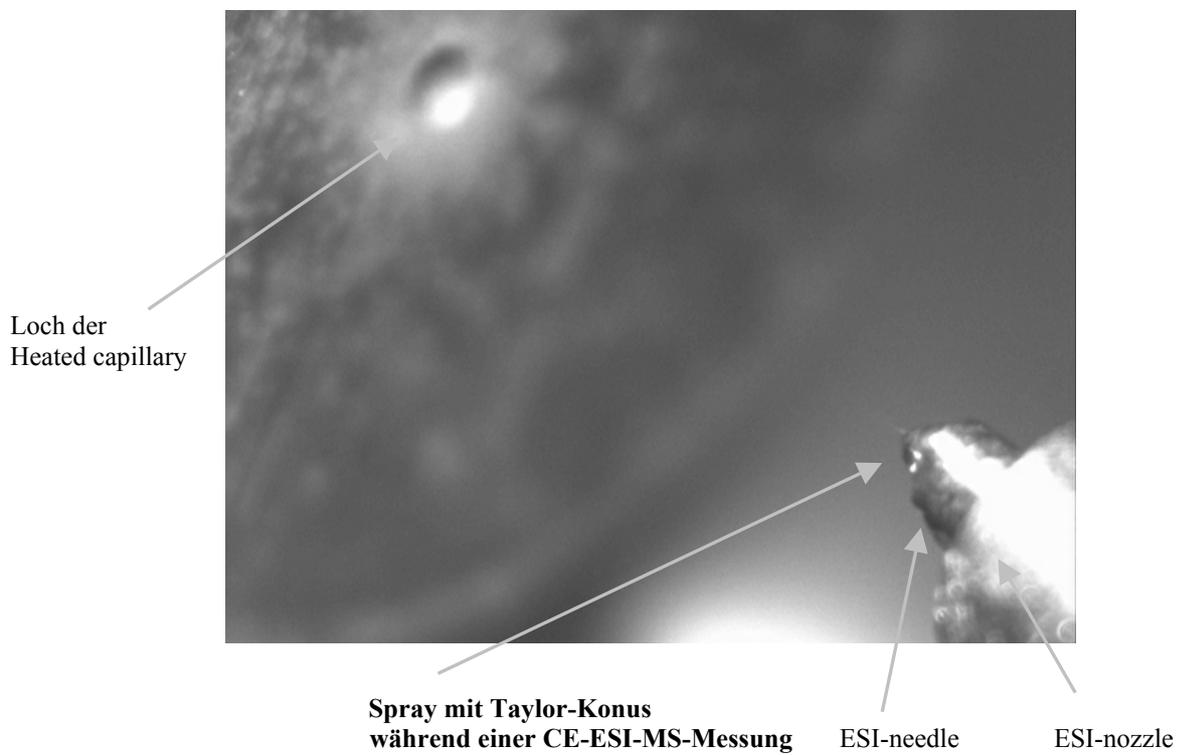
Die x- und z-Achse der beweglichen Einheit dienen zur exakten Positionierung des ESI-Spraykopfes vor der heated capillary.



**Abb. 76:** oben: Original CE-ESI-MS-Adapter für Thermoquest Finnigan LCQ duo; unten: modifiziertes Interf.

An dieser beweglichen Einheit wurde eine Präzisionsskala angebracht (Merck, Darmstadt). Eine alte ESI-Nadel diente als Bezugspunkt. Mit einer Lupe war es möglich, die kleine Skala abzulesen und somit den exakten Abstand einstellen zu können.

Mit dieser Vorrichtung konnte ein stabiler Spray (samt Taylor-Konus und Jet) erhalten und visuell kontrolliert werden (Abb. 77).



**Abb. 77:** Ausbildung des Taylor-Konus und Jet während Anlegen von ESI-Spannung

## 7. Literaturverzeichnis

- Altria, K., 1999. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography*, 856: 443-463.
- Bahadir, M. and Parlar, H., 2000. In: M. Spiteller (Editor), *Springer Umweltlexikon*. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, N.Y.
- Banks, J., 1997. Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray/mass spectrometry. *Electrophoresis*, 18: 2255-2266.
- Barroso, M., Konda, L. and Morovojan, G., 1999. Multiresidue analysis of phenylurea herbicides in environmental and drinking water by capillary electrophoresis. *Journal of High Resolution Chromatography*, 22: 171-176.
- Bayer, E., Gförer, P. and Rentel, C., 1999. Coordination-Ionspray-MS (CIS-MS), a universal detection and characterization method for direct coupling with separation techniques. *Angew Chem Int Ed*, 38(7): 992-995.
- Benthin, B., Danz, H. and Hamburger, M., 1999. Pressurized liquid extraction of medicinal plants. *Journal of Chromatography*, 837: 211-219.
- Berger, B. and Wolfe, N., 1996. Multiresidue determination of sulfonylurea herbicides by capillary electrophoresis for hydrolysis studies in water and sediments. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 356(8): 508-511.
- Bianco, G., Schmitt-Kopplin, P., Benedetto, G., Kettrup, A. and Cataldi, T., 2001 (poster). Analysis of glycoalkaloids coupled with electrospray ionization ion trap mass spectrometry (CE-ESI/ion trap MS).
- Bjarnason, B., Chimuka, L. and Ramström, O., 1999. On-line solid-phase extraction of triazine herbicides using a molecularly imprinted polymer for selective sample enrichment. *Anal Chem*, 71: 2152-2156.
- Bruins, A., 1998. Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography*, 794: 345-357.
- Budzikiewicz, H., 1998., *Massenspektrometrie*. Springer Verlag, Weinheim.

- Cai, J. and El Rassi, Z., 1992. On-line preconcentration of triazine herbicides with tandem octadecyl capillaries-capillary zone electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography*, 15(6/7): 1179-1192.
- Carabias Martinez, R., Gonzalo, E., Dominguez, A., Alvarez, J. and Mendez, J., 1996. Determination of triazine herbicides in water by micellar elektrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography*, 733: 349-360.
- Carabias Martinez, R., Rodriguez-Gonzalo, E., Dominguez-Alvarez, J. and Hernandez-Mendez, J., 1997. Capillary Zone Electrophoresis in Nonaqueous Solvents in the Presence of Ionic Additives. *Anal Chem*, 69: 4437-4444.
- Chang, S. and Liao, C., 2002. in press. Analysis of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphoric acid by capillary electrophoresis with indirect fluorescence detection. *Journal of Chromatography*.
- Chapman, J. and Hobbs, J., 1999. Putting capillary electrophoresis to work. *LC-GC*, 2: 86.
- Cikalo, M., Goodall, D. and Matthews, W., 1996. Analysis of glyphosate using capillary electrophoresis with indirect detection. *Journal of Chromatography*, 745: 189-200.
- Cole, R., 2000. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 35: 763-772.
- Constantopoulos, T., Jackson, G. and Enke, C., 2000. Challenges in achieving a fundamental model for ESI. *Analytica Chimica Acta*, 406: 37-52.
- Desiderio, C., Polcaro, C. and Fanali, S., 1997a. Stereoselective analysis of herbicides by capillary electrophoresis using sulfobutyl ether beta-cyclodextrin as chiral selector. *Electrophoresis*, 18: 227-234.
- Desiderio, C., Polcaro, C., Padiglioni, P. and Fanali, S., 1997b. Enantiomeric separation of acidic herbicides by capillary electrophoresis using vancomycin as chiral selector. *Journal of Chromatography*, 781: 503-513.
- Deyl, Z., 1998. Advanced chromatographic and electromigration methods in biosciences. *Journal of Chromatography Library*, 60.
- Dinelli, G., Bonetti, A., Catizone, P. and Galletti, G., 1994. Separation and detection of herbicides in water by micellar elektrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography B*, 656: 275-280.
- Dinelli, G., Vicari, A. and Bonetti, A., 1995a. Separation of sulfonylurea metabolites in water by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 700: 195-200.

- Dinelli, G., Vicari, A. and Brandolini, V., 1995b. Detection and quantitation of sulfonylurea herbicides in soil at the ppb level by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 700: 201-207.
- Dinelli, G., Vicari, A. and Catizone, P., 1996. Monitoring of herbicide pollution in water by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 733: 337-347.
- Dole, M. et al., 1968. Molecular beams of macroions. *J Chem Phys*, 49: 2240-2249.
- Eberl, L., 1999. N-Acyl homoserinlactone-mediated gene regulation in gram negative bacteria. *System Appl. Microbiol.*, 22: 493-506.
- El Rassi, Z., 2000. Chiral glycosidic surfactants for enantiomeric separation in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 875: 207-233.
- Elgstoen, K., Zhao, J., Anacleto, J. and Jellum, E., 2001. Potential of capillary electrophoresis, tandem mass spectrometry and coupled capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry as diagnostic tools. *Journal of Chromatography*, 914: 265-275.
- Fanali, S. 1997. Controlling enantioselectivity in chiral capillary electrophoresis with inclusion-complexation. *Journal of Chromatography*. 792: 227-267.
- Farran, A. and Ruiz, S., 1995a. Effect of aliphatic alcohols as mobile phase modifiers on separation of phenylurea and phenoxyalkyl acid herbicides by micellar elektrokinetic capillary chromatography. *Anal Chim Acta*, 317: 181-188.
- Farran, A. and Ruiz, S., 1995b. Simultaneous separation of neutral and acidic herbicides by micellar elektrokinetic capillary chromatography. *Intern J Environ Anal Chem*, 58: 121-129.
- Farran, A., Ruiz, S., Serra, C. and Aguilar, M., 1996. Comparative study of high-performance liquid chromatography applied to the analysis of different mixtures of pesticides. *Journal of Chromatography*, 737: 109-116.
- Farran, A., Serra, C. and Sepaniak, M., 1999. Three different approaches for the separation of MCPA and 2,4-D by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 835: 209-215.
- Fenn, J., 1993. Ion Formation from charged droplets: roles of geometry, energy, and time. *J Am Soc Mass Spectrom*, 4: 524-535.
- Figeys, D., Ducret, A. and Aebersold, R., 1997. Identification of proteins by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, evaluation of an on-line solid-phase extraction device. *Journal of Chromatography*, 763: 295-306.

- Finizio, A., Vighi, M. and Sandroni, D., 1997. Determination of n-octanol/water partition coefficient ( $K_{ow}$ ) of pesticides, critical review and comparison of methods. *Chemosphere*, 34(1): 131-161.
- Freitag, D., Schmitt-Kopplin, P., Simon, R., Kaune, A. and Kettrup, A., 1999. Interactions of hydroxy-s-triazines with sodium dodecyl sulfate-micelles investigated by micellar capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 20: 1568-1577.
- Fuqua, W., Winans, S. and Greenberg, E., 1994. Quorum sensing in bacteria: the lux-r-lux-i family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol.*, 176: 269-275.
- Galceran, M., Carneiro, M. and Puignou, L., 1994. Capillary electrophoresis of quaternary ammonium ion herbicides: paraquat, diquat and difenzoquat. *Chromatographia*, 39(9/10): 581-586.
- Galceran, M., Carneiro, N., Diez, M. and Puignou, L., 1997. Separation of quaternary ammonium herbicides by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Journal of Chromatography*, 782: 289-295.
- Garcia, F. and Henion, J., 1992. Fast capillary electrophoresis-ion spray mass spectrometric determination of sulfonylureas. *Journal of Chromatography*, 606: 237-247.
- Garrison, A., Schmitt, P. and Kettrup, A., 1994. Separation of phenoxy acid herbicides and their enantiomers by high-performance capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 688: 317-327.
- Garrison, A., Schmitt, P., Martens, D. and Kettrup, A., 1996. Enantiomeric selectivity in the environmental degradation of dichlorprop as determined by high-performance capillary electrophoresis. *Environ Sci Technol*, 20: 2449-2455.
- Gaskell, S., 1997. Electrospray: Principles and Practice. *Journal of Mass Spectrometry*, 32: 677-688.
- Geisenberger, O., 2000. Nachweis, Verbreitung und Bedeutung von N-acyl-L-homoserinlactonen bei Gram-negativen Bakterien, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München.
- Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R., Andreoni, V., Vincenti, M., Acquati, A., 1994. Anaerobic degradation of acifluorfen by different enrichment cultures. *J Agric Food Chem*, 42: 1232-1236.

- Guan, F., Wu, H. and Luo, H., 1996. Sensitive and selective method for the determination of sodium monofluoroacetate by capillary zone-electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 719: 421-426.
- Guardino, X., Obiols, J., Rosell, M., Farran, A. and Serra, C., 1998. Determination of chlorpyrifos in air, leaves and soil from a greenhouse by gas-chromatography with nitrogen-phosphorus detection, high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 823: 91-96.
- Haas, U., 1988., *Physik für Pharmazeuten und Mediziner*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- He, Y. and Lee, H., 1997. Combination of solid-phase extraction and field-amplified concentration for trace analysis of organonitrogen pesticides by micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, 18: 2036-2041.
- Hinsmann, P., Arce, L., Ricos, A. and Valcaracel, M., 2000. determination of pesticides in waters by automatic on-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 866: 137-146.
- Iribarne, J. and Thomson, B., 1976. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J Chem Phys*, 64: 2287-2294.
- Isoo, K., Otsuka, K. and Terabe, S., 2001. Application of sweeping to micellar electrokinetic chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometric analysis of environmental pollutants. *Electrophoresis*, 22(16): 3426-3432.
- Iwata, T., Koshoubu, J. and Kurosu, Y., 1998. Electropherograms in capillary zone electrophoresis plotted as a function of the quantity of electric charge. *Journal of Chromatography*, 810: 181-191.
- Jorgenson, J. and Lukacs K., 1981. Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries. *Anal Chem.*, 53: 1298-1302.
- Jorgenson, J. and Lukacs K., 1983. Capillary Zone Electrophoresis. *Science*, 222: 266-272.
- Jung and Brumley, W., 1995. Trace analysis of fluorescein-derivatized phenoxy acid herbicides by micellar electrokinetic chromatography with laser induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography*, 717: 299-308.
- Karcher, A. and El Rassi, Z., 1997. Capillary electrophoresis of pesticides: V. Analysis of pyrethroid insecticides via their hydrolysis products labeled with a fluorescing and UV absorbing tag for laser-induced fluorescence and UV detection. *Electrophoresis*, 18: 1173-1179.

- Kataoka, H., 1998. Chromatographic analysis of lipoic acid and related compounds. *Journal of Chromatography B*, 717: 247-262.
- Kebarle, P., 2000. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 35: 804-817.
- Kirby, D., Thorne, J., Götzinger, W. and Karger, B., 1996. A CE/ESI-MS interface for stable, low flow-operations. *Anal Chem*, 68: 4451-4457.
- Koezuka, K., Ozaki, H., Matsubara, N. and Terabe, S., 1997. *Journal of Chromatography B*, 689: 3-11.
- Krynitsky, A., 1997. Determination of sulfonylurea herbicides in water by capillary electrophoresis and by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 80(2): 392-400.
- Krynitsky, A. and Swineford, D., 1995. Determination of sulfonylurea herbicides in grains by capillary electrophoresis. *Journal of AOAC International*, 78(4): 1091-1096.
- Kubilius, D. and Bushway, R., 1998. Determination of hexazinone and its metabolites in groundwater by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 793: 349-355.
- Kuhn, R. and Hofstetter-Kuhn, S., 1993., *Capillary electrophoresis: principles and practice*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Labowsky, M., Fenn, J. and Fernandez, M., 2000. A continuum model for ion evaporation from a drop: effect of curvature and charge on ion solvation energy. *Anal Chim Acta*, 406: 105-118.
- Lancas, F., Rissato, S. and Galhiane, M., 1999. Determination of 2,4-D and dicamba in food crops by MEKC. *Chromatographia*, 50(1/2): 35-40.
- Lemiere, F., 2001. Interfaces for LC-MS. *LC-GC*, 12: 2-8.
- Lewenza, S., Conway, B. and Greenberg, E., 1999. Quorum sensing in *Bukholderia cepacia*. *J Bacteriol.*, 181: 748-756.
- Lewis, D. et al., 1999. Influence of environmental changes on degradation of chiral pollutants in soils. *Nature*, 401: 898-901.
- Lo, C., Lee, Y. and Chang, C., 1995. High-performance capillary electrophoretic method for the determination of blasticidin S in formulated products. *J Agric Food Chem*, 43: 2892-2895.
- Loo, J., 2000. Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes. *Int Mass Spectrom*, 200: 175-186.

- Loos, R. and Niessner, R., 1999. Analysis of atrazine, terbuthylazine and their N-dealkylated chloro and hydroxy metabolites by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis ultraviolet detection. *Journal of Chromatography*, 835: 217-229.
- Lu, Y. et al., 2001. Pulsed electrospray for mass spectrometry. *Anal Chem*, 73: 4748-4753.
- Majors, R., 1998. A review of modern solid phase extraction. *LC-GC*, 5: 8.
- Mammen, M., Colton, I., Carbeck, J., Bradley, R. and Whitesides, G., 1997. Representing primary electrophoretic data in the 1/time domain: Comparison to representations in the time domain. *Anal Chem*, 69: 2165-2170.
- Martin-Giardieu, A. and Renoud-Gonnord, M., 2000. Optimization of a capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry method for the quantitation of the 20 natural amino acids in childrens blood. *Journal of Chromatography B*, 742: 163-171.
- Matchett, W., Winnik, W. and Brumley, W., 1996. Capillary electrophoretic behavior of seven sulfonylureas. *J Cap Elec*, 3(4): 1996.
- McLaughlin, G., Weston, A. and Hauffe, K., 1996. Capillary electrophoresis methods development and sensitivity enhancement strategies for the separation of industrial and environmental chemicals. *Journal of Chromatography*, 744: 123-134.
- Mechref, Y. and El Rassi, Z., 1996. Micellar elektrokinetic capillary chromatography with in-situ charged micelles; VI. Evaluation of novel chiral micelles consisting of steroidal-glycoside surfactant-borate complexes. *Journal of Chromatography*, 724: 285-296.
- Mechref, Y. and El Rassi, Z., 1997. Capillary electrophoresis of herbicides, II. Evaluation of alkylglucoside chiral surfactants in the enantiomeric separation of phenoxy acid herbicides. *Journal of Chromatography*, 757: 263-273.
- Menzinger, F., Schmitt-Kopplin, P., Freitag, D. and Kettrup, A., 2000. Analysis of agrochemicals by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 891: 45-67.
- Menzinger, F., Schmitt-Kopplin, P., Frommberger, M., Freitag, D. and Kettrup, A., 2001. Partial filling micellar elektrokinetic chromatography and non-aqueous capillary electrophoresis of selected agrochemicals. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 371(1): 25-34.
- Michalke, B. and Schramel, P., 1999. Antimony speciation in environmental samples by interfacing capillary electrophoresis on-line to an inductively coupled plasma mass spectrometer. *Journal of Chromatography*, 834: 341-348.

- Michalke, D., Kolb, S. and Welsch, T., 2001. Influence of buffer concentration on efficiency in partial filling micellar elektrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography*, 916: 113-122.
- Ministerium, 1998. Jahresbericht, Ministerium für Ernährung Landwirtschaft und Forsten.
- Morales, S. and Cela, R., 1999. Capillary electrophoresis and sample stacking in non-aqueous media of priority pollutant phenols. *Journal of Chromatography*, 846: 401-411.
- Muijselaar, P., Otsuka, K. and Terabe, S., 1998. On-line coupling of partial-filling micellar elektrokinetic chromatography with mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 802: 3-15.
- Nelson, W. and Lee, C., 1996. Mechanistic studies of partial-filling micellar elektrokinetic chromatography. *Anal Chem*, 68: 3265-3269.
- Nelson, W., Tang, Q., Haratta, A. and Lee, C., 1996. On-line partial filling micellar elektrokinetic chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 749: 219-226.
- Nemoto, S. and Lehotay, S., 1998. Analysis of multiple herbicides in soybeans using pressurized liquid extraction and capillary electrophoresis. *J Agric Food Chem*, 46: 2190-2199.
- Nielen, M., 1995. Industrial applications of capillary zone electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 712: 269-284.
- Nunez, O., Moyano, E. and Galceran, M., 2002. Solid-phase extraction and sample stacking-capillary electrophoresis for the determination of quaternary ammonium herbicides in drinking water. *Journal of Chromatography*, 946: 275-282.
- Olumee, Z., Callahan, J. and Vertes, A., 1998. Droplet dynamics changes in electrostatic sprays of methanol-water mixtures. *Journal of Physical Chemistry A*, 102: 9154-9160.
- Otsuka, K. et al., 1998. Stereoselective separation and detection of phenoxy acid herbicide enantiomers by cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 817: 75-81.
- Ozaki, H., Itou, N., Takada, Y., Sakairi, M. and Koizumi, H., 1995. Micellar elektrokinetic chromatography-mass spectrometry using a high-molecular-mass surfactant; On-line coupling with an electrospray ionization interface. *Journal of Chromatography*, 716: 69-79.

- Ozaki, H. and Terabe, S., 1998. On-line micellar elektrokinetic chromatography-mass spectrometry with a high-molecular-mass surfactant. *Journal of Chromatography*, 794: 317-325.
- Pacakova, V., Stulik, K. and Jiskra, J., 1996. High performance separations in the determination of triazine herbicides and their residues. *Journal of Chromatography*, 754: 17-31.
- Padarauskas, A., Olsauskaite, V. and Paliulionyte, V., 1998. Simultaneous determination of inorganic anions and cations in waters by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 829: 359-365.
- Penmetsa, K., Leidy, R. and Shea, D., 1996. Herbicide analysis by micellar elektrokinetic chromatography. 745, 201-208.
- Penmetsa, K., Leidy, R. and Shea, D., 1997a. Enantiomeric and isomeric separation of herbicides using cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 790: 225-234.
- Penmetsa, K., Leidy, R. and Shea, D., 1997b. Separation of fungicides by micellar elektrokinetic capillary chromatography. *Electrophoresis*, 18: 235-240.
- Perez-Ruiz, T., Martinez-Lozano, C., Sanz, A. and Tomas, V., 1996. Simultaneous determination of diquat and paraquat residues in various matrices by capillary zone electrophoresis with diode array detection. *Chromatographia*, 43(9/10): 468-472.
- Petersson, M., Wahlund, K. and Nilsson, S., 1999. Miniaturised on-line solid-phase extraction for the enhancement of concentration sensitivity in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 841: 249-261.
- Pietta, P. et al., 1999. Application of capillary electrophoresis at low pH to oligonucleotides quality control. *Journal of Chromatography*, 853: 355-358.
- Pobozy, E., Glod, B., Kaniewska, J. and Trojanowicz, M., 1995. Determination of triorganotin compounds by ion chromatography and capillary electrophoresis with preconcentration using solid-phase extraction. *Journal of Chromatography*, 718: 329-338.
- Pyell, U. and Bütchorn, U., 1995. Optimization of resolution in micellar elektrokinetic chromatography via computer-aided simultaneous variation of concentrations of sodium dodecyl sulfate as modifier. *Journal of Chromatography*, 716: 81-95.
- Quirino, J., 1999. Sweeping of analyte zones in elektrokinetic chromatography. *Anal Chem*, 71: 1638-1644.

- Quirino, J., Inoue, N. and Terabe, S., 2000. Reversed migration micellar electrokinetic chromatography with off-line and on-line concentration analysis of phenylurea herbicides. *Journal of Chromatography*, 892: 187-194.
- Quirino, J. and Terabe, S., 1998. Exceeding 5000-fold concentration of dilute analytes in micellar electrokinetic chromatography. *Science*, 282: 465-468.
- Quirino, J., Terabe, S., Otsuka, K., Vincent, J. and Vigh, G., 1999. Sample concentration by sample stacking and sweeping using a microemulsion and a single-isomer sulfated beta-cyclodextrin as pseudostationary phases in electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography*, 838: 3-10.
- Rentel, C., Gförer, P. and Bayer, E., 1999. Coupling of capillary electrochromatography to coordination ion spray mass spectrometry, a novel detection method. *Electrophoresis*, 20: 2329-2336.
- Rodriguez, R., Pico, Y., Font, G. and Manes, J., 2002. Analysis of thiabendazole and procymidone in fruits and vegetables by capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 949: 359-366.
- Rossi, M. and Rotilio, D., 1997. Analysis of carbamate pesticides by micellar electrokinetic chromatography. *J High Resol Chromatogr*, 20: 265-269.
- Rudaz, S., Cherkaoui, S., Dayer, P., Fanali, S., Veuthey, J., 2000. Simultaneous stereoselective analysis of tramadol and its main phase I metabolites by on-line capillary zone electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography*: 868: 295-303.
- Rücker, G., Neugebauer, M. and Willems, G., 1992., *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Sarmini, K., Kenndler, E., 1997. Influence of organic solvents on the separation selectivity in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 792: 3-11.
- Scrano, L. , 2002, in Vorbereitung
- Schmitt, P., Freitag, D., Sanlaville, Y., Lintelmann. and Kettrup, A., 1995. Capillary electrophoretic study of atrazine photolysis. *Journal of Chromatography*, 709: 215-225.
- Schmitt, P., Garrison, A., Freitag, D. and Kettrup, A., 1996. Separation of s-triazine herbicides and their metabolites by capillary zone electrophoresis as a function of pH. *Journal of Chromatography*, 723: 169-177.

- Schmitt, P., Garrison, A., Freitag, D. and Kettrup, A., 1997. Application of cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography to the separations of selected neutral pesticides and their enantiomers. *Journal of Chromatography*, 792: 419-429.
- Schmitt-Kopplin, P.; 2002. Comprehensive approaches for the characterization of polydisperse natural organic matter (NOM) with capillary-electrophoresis-electrospray ionization/mass spectrometry (CE-ESI/MS), Habilitationsschrift Technische Universität München.
- Schmitt-Kopplin, P., Fischer, K., Freitag, D. and Kettrup, A., 1998. Capillary electrophoresis for the simultaneous separation of selected carboxylated carbohydrates and their related 1,4-lactones. *Journal of Chromatography*, 807: 89-100.
- Schmitt-Kopplin, P., Garmash, A., Kudryavtsev, A., Menzinger, F., Perminova I., Hertkorn, N., Freitag, D., Petrosyan, V., Kettrup, A., 2001. Quantitative and qualitative precision improvements by effective mobility-scale data transformation in capillary electrophoresis analysis. *Electrophoresis*, 22: 77-87.
- Schmitt-Kopplin, P., Hertkorn, N., Freitag, D. and Kettrup, A., 1999a. Mobility distribution of synthetic and natural polyelectrolytes with capillary zone electrophoresis. *J AOAC Int*, 82: 1594-1603.
- Schmitt-Kopplin, P., Scoen, U., Egeberg, P., Freitag, D., Kettrup, A. 1999b. Capillary Zone Electrophoretic studies on norwegian surface water natural organic matter. *Environment International*, 25: 259-274.
- Schmitt-Kopplin, P. et al., 1997. Simultaneous determination of ionization constants and isoelectric points of 12 hydroxy-s-triazines by capillary zone electrophoresis and capillary isoelectric focusing. *Anal Chem*, 69: 2559-2566.
- Smith, J. and El Rassi, Z., 1994a. Micellar electrokinetic capillary chromatography with in situ charged micelles: 3. Evaluation of alkylglucoside surfactants as anionic butylboronate complexes. *Electrophoresis*, 15: 1248-1259.
- Smith, J. and El Rassi, Z., 1994b. Micellar electrokinetic capillary chromatography with in situ charged micelles IV. Influence of the nature of the alkylglycoside surfactant. *Journal of Chromatography*, 685: 131-143.
- Smith, J., Nashabeh, W. and El Rassi, Z., 1994c. Micellar electrokinetic capillary chromatography with in situ charged micelles. 1. Evaluation of N-D-gluco-N-mehtylalkanamide surfactants as anionic borate complexes. *Anal Chem*, 66: 1119-1133.

- Song, X. and Budde, W., 1996. Capillary electrophoresis-electrospray mass spectra of the herbicides paraquat and diquat. *J Am Soc Mass Spectrom*, 7: 981-986.
- Song, X. and Budde, W., 1998. Determination of chlorinated acid herbicides and related compounds in water by capillary electrophoresis-electrospray negative ion mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 829: 327-340.
- Spagone, C., D'Orazio, C., Rossi, M. and Rotilio, D., 1996. Separation of chlorphenoxy acid herbicides by capillary zone electrophoresis. *J High Resol Chromatogr*, 19: 647-650.
- Strohschein, S., Rentel, C., Lacker, T., Bayer, E. and Albert, K., 1999. Separation and identification of tocotrienol isomers by HPLC-MS and HPLC-NMR coupling. *Anal Chem*, 71: 1780-1785.
- Süsse, H. and H., M., 1996. Pesticide analysis by micellar elektrokinetic capillary chromatography. *J Biochem Biophys Methods*, 730: 337-343.
- Süsse, H. and Müller, H., 1995. Application of micellar elektrokinetic capillary chromatography to the analysis of pesticides. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 352(5): 470-473.
- Tanaka, Y. and Terabe, S., 1995. Partial separation zone technique for the separation of enantiomers by affinity electrokinetic chromatography with proteins as chiral pseudo-stationary phases. *Journal of Chromatography*, 694: 277-284.
- Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A., Ando, T., 1983. Elektrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries, *Anal Chem.*, 56: 111-113.
- Terabe, S., Ozaki, H., Takada, Y., Sakairi, M. and Koizumi, H., 1995. Proceedings of the seventh international symposium on high performance capillary electrophoresis., 53.
- Thermoquest, 1999., Finnigan LCQ duo-hardware manual. Thermoquest, technical publications, San Jose, California.
- Thomson, B. and Iribarne, J., 1979. Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *J Chem Phys*, 71(11): 4451-4456.
- Trinkwasserverordnung, Bekanntmachung der Neufassung der Trinkwasserverordnung vom 5.12.1990 (BGBL I, S. 2612), ber. 23.1.1991 (BGBL I, S. 227) i.d.F. der Zuständigkeitsanpassungsverordnung vom 26.2.1993 (BGBL I, S. 278), ber. 1.4.1998 (BGBL I, S. 699), ber. 20.7.2000 (BGBL I, S.2000).
- Tsai, C., Chen, Y. and Her, G., 1998. Analysis of triazines by reversed electroosmotic flow capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 813: 379-386.

- Valtcheva, L., Mohammed, J., Petterson, G. and Hjerten, S., 1993. Chiral separation of betablockers by high-performance capillary electrophoresis based on non-immobilized cellulase as enantioselective protein. *Journal of Chromatography*, 638: 263-267.
- van Berkel, G., 2000. Electrolytic deposition of metals on to the high-voltage contact in an electrospray emitter: implications for gas-phase ion formation. *Journal of Mass Spectrometry*, 35: 773-783.
- van de Merbel, N., 1999. Membrane-based sample preparation coupled on-line to chromatography or electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 856: 55-82.
- von Brocke, A., Nicholson, G. and Bayer, E., 2001. Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 22: 1251-1266.
- Vulliet, E., Emmelin, C., Scrano, L., Bufo, S., Chovelon, J., Meallier, P., Grenier-Loustalot, M. 2001. Photochemical Degradation of Acifluoren in aqueous solution. 49: 4795-4800.
- Vulliet, E., Emmelin, C., Chovelon, J., Guillard, C. and Herrmann, J., 2002. Photocatalytic degradation of sulfonylurea herbicides. *Applied Catalyst B: Environmental*, 1006: 1-11.
- Wang, C., Huang, H., Kuo, K. and Hsieh, Y., 1998. Analysis of puerariae radix and its medicinal preparations by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 802: 225-231.
- Whang, K. and Whang, C., 1997. Capillary electrophoresis of organotin compounds with indirect UV detection. *Electrophoresis*, 18: 241-246.
- Whatley, H., 2001., PACE setter, pp. 11.
- Whitehouse, C., Dreyer, R., Yamashita, M. and JB., F., 1985. Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. *Anal Chem*, 57: 675-679.
- Williams, B. and Trenerry, C., 1996. The direct separation of the diastereoisomers and enantiomers of the fungicide triadimenol by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Cap Elec*, 3(4): 223-228.
- Wood, D., Gong, F., Daykin, M., Williams, P. and Pierson, L., 1997. N-Acyl homoserin lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *J Bacteriol.*, 179: 7663-7670.
- Wycherley, D., Rose, M., Giles, K., Hutton, T. and Rimmer, D., 1996. Capillary electrophoresis with detection by inverse UV spectroscopy and electrospray mass

- spectrometry for the examination of quaternary ammonium herbicides. *Journal of Chromatography*, 734: 339-349.
- Yamashita, M. and Fenn, J., 1984. Electrospray ion source. Another Variation on the free-jet theme. *J Phys Chem*, 88: 4451-4459.
- Yang, J., Long, H., Liu, H., Huang, A. and Sun, Y., 1998. Analysis of tetrandrine and fangochinoline in traditional Chinese medicines by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 811: 274-279.
- Yang, L., Haratta, A. and Lee, C., 1997. On-line micellar electrokinetic chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using anodically migrating micelles. *Anal Chem*, 69: 1820-1826.
- Yang, L. and Lee, C., 1997. Micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 780: 207-218.
- Zook, J. and Bruins, A., 1997. On cluster ions, ion transmission, and linear dynamic range limitations in electrospray (ionspray) mass spectrometry. *Int Mass Spectrom Ion Proc*, 162: 129-147.

# Lebenslauf und Ausbildungsgang

**Name:** Franz, Wolfgang Menzinger

**Geburtsdatum:** 04.05.1971  
in Fürstenfeldbruck

**Eltern:** Friedrich Menzinger, Studiendirektor a.D.  
Ricarda Menzinger, Hausfrau

## Schulbildung

1978-1983 Volksschule Obertraubling  
1983-1992 Gymnasium Neutraubling,  
Abschluss mit Allgemeiner Hochschulreife

## Wehrdienst

1992-1993 Grundwehrdienst in Regensburg, Ausbildung zum  
Feuerleitsoldat

## Studium

1993-1997 Studium der Lebensmittelchemie an der Friedrich-Alexander-  
Universität Erlangen-Nürnberg,  
Abschluss mit 1. Staatsexamen

## Praktische Ausbildung

1998-1999 Praktikum am Landesuntersuchungsamt für das  
Gesundheitswesen Nordbayern in Erlangen, in den Bereichen  
Lebensmittel, Bedarfsgegenstände und Wasser,  
Abschluss mit 2. Staatsexamen

1999 Befähigung zum staatl. gepr. Lebensmittelchemiker

## **Dissertation**

Seit 1999 bis  
7.2002

Anfertigung einer Dissertation mit dem Thema: „Optimierung einer Kapillarelektrophorese-Elektrospray-Massenspektrometrie (CE-ESI-MS)-Kopplung zur Strukturidentifizierung und quantitativen Analyse von polaren, organischen Substanzen“

## **Beruf**

Seit 19.8.2002

Unterstützung der Leitung der pharmazeutischen Stabilitäts-, Freigabe- und Entwicklungsanalytik an der LPU, Labor für Pharma- und Umweltanalytik, Martinsried